

**Physiologische und Verfahrenstechnische
Grundlagenuntersuchungen zum Einsatz von Starterkulturen für
die Manganoxidation bei der Aufbereitung von Mineral-
Rohwässern nach aktuellem Lebensmittelrecht**

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
Dissertation

von Andreas Hoffmann
aus Helmstedt

1. Referent:	Prof. Dr. H.H. Hanert
2. Referent:	Prof. Dr. W.D. Deckwer
Eingereicht am:	14.02.2005
Mündliche Prüfung (Disputation) am:	07.06.2005
Druckjahr	2005

meinen Eltern in Dankbarkeit

Danksagung

Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden vom April 1999 bis zum Juni 2004 in der Abteilung „Technische Umweltmikrobiologie“ des Instituts für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.H. Hanert danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, die intensive wissenschaftliche Betreuung und die vielen Anregungen und die persönliche Unterstützung auch in schweren Zeiten.

Für die Übernahme des Co-Referats danke ich Herrn Prof. Dr. W.D. Deckwer.

Herrn Dr. P. Harborth und Herrn Dr. M. Kucklick danke ich für die vielen praktischen Hilfen und Tipps im technischen und analytischen Bereich. Ein Dank gilt ebenso Herrn B. Hoppe für die Unterstützung auf dem administrativen Sektor.

Herrn Dipl. Biol. A. Mitschke danke ich insbesondere für die reichliche Unterstützung bei diversen Computerproblemen, Herrn Dipl. Biol. H.–J. Ephan, Caroline Machlitt und Matthias Thieme und vielen weiteren ehemaligen Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima innerhalb der Gruppe.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meiner Frau Kerstin, meinen Eltern und Schwiegereltern für die vielfältige Unterstützung in den letzten Jahren.

Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Herrn Prof. Dr. H.H. Hanert, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

A.HOFFMANN, H.H. HANERT

Die Entwicklung von Starterkulturen für die natürlich-biologische Enteisung und Entmanganung von Mineralwässern; Poster auf der Jahrestagung der VAAM 24.-27.3.2002 Göttingen

Abstract

Untreated Natural Mineral Waters often contain dissolved bivalent iron and manganese. These elements have to be removed, because they result to brown or black deposits. Those waters would be surly unmarketable. The common treatment method to remove those elements from the water uses ozone-enriched air and filtration. This method is rather expensive and there has to be a declaration of the use of ozone (Directive 96/70/EC of the European Parliament and of the Council). Although iron- or manganese-oxidizing bacteria have been used in groundwater plants for many decades, it is not necessarily easy to adapt this method on Mineral-Waters, as there can be special conditions, like high concentrations of hydrogencarbonate, minerals and trace elements and a different pH-value.

Manganese-oxidizing strains were used to initiate a microbiological removal of manganese. Physiological examinations were done to check the abilities of those microorganisms as starting cultures.

Eighteen manganese-oxidizing strains were enriched and isolated from different habitats and physiologically examined. A two-phase medium was established, as some of the isolated organisms refused to oxidize manganese in a pure liquid medium. Physiological examinations led to the conclusion, that the taxonomical diversity of manganese-oxidizing bacteria is much greater than known so far. Further tests of five isolates showed, that effects on manganese-oxidation-systems can lead to difficulties. Small amounts of trace elements, copper or minerals may prevent oxidation processes. Other parameters like temperature, oxygen or pH-value have great effects, but do not inhibit the desposition within ranges comparable to those in mineral waters.

Further investigations have been carried out in a testing-plant with two different waters. The manganese of both waters could be removed with isolates of the *Leptothrix*-group within some hours. After that, the concentrations of manganese did not increase within several weeks. Although one water contained 11mg/L ammonium, there was no nitrite detectable in the outflow of the testing plant after some days.

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-(piperazin)]-ethansulfonsäure
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
MTV	Mineral- und Tafelwasserverordnung
TWV	Trinkwasserverordnung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanz

Chemikalienliste

Chemikalienname	Chemische Formel	Qualität	Hersteller, Nummer
Agar	$(C_{12}H_{18}O_9)_x$	BioChemika pulv.	Fluka Nr. 05040
Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	p.a.	Merck Nr. 44892
Ammoniumeisen(III)-citrat	-	p.a.	Fluka Nr. 09713
Ammoniumsulfat	$(NH_4)SO_4$	p.a.	Fluka Nr. 09982
Benzidin (4,4'-Diamino-biphenyl)	$NH_2C_6H_4C_6H_4NH_2$	p.a.	Fluka Nr. 12115
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	p.a.	Merck Nr. 144482
Calciumsulfat	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	purum p.a	Fluka Nr. 21245
DAPI 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid)	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	BioChemika	Fluka Nr. 32670
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	p.a.	Fluka Nr. 71645
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	p.a	Fluka 44970
Eisen(III)chlorid	$FeCl_3$	p.a.	Fluka Nr. 44943
Essigsäure	CH_3COOH	purum	Fluka Nr. 45740

Fleischextrakt	-	BioChemika	Fluka Nr. 70164
Fuchsin	-	Für die Mikroskopie	Fluka Nr. 47860
D(+)-Glucose wasserfrei	$C_6H_{12}O_6$	BioChemika	Fluka Nr. 49140
Glutardialdehyd	$OHC(CH_2)_3CHO$	p.a.	Merck Nr. 14393
Glycerol	$C_3H_8O_3$	p.a.	Fluka Nr. 49770
Hefeextrakt	-	BioChemika	Fluka Nr. 70161
HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- 1-ethansulfonsäure	$C_8H_{18}N_2O_4S$	BioChemika	Fluka Nr. 54461
HMDS Hexamethyldisilazan	$C_6H_{19}NSi_2$	purum	Fluka Nr. 52620
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	p.a.	Fluka Nr. 60230
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	p.a.	Merck Nr. 05886
Mangan(II)carbonat	$MnCO_3$	p.a.	Merck Nr. 05924
Mangansulfat-Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	p.a.	Fluka Nr. 63554
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Puriss.	Fluka Nr. 15990
Pepton	-	BioChemika	Fluka Nr. 70175
Phenol	C_6H_5OH	Puriss.	Fluka Nr. 77610
Salzsäure	HCl	p.a.	Fluka Nr. 84419
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	p.a.	Merck Nr. 928348
Trypticase (Pepton aus Casein, tryptisch verdaut)	-	BioChemika	Fluka Nr. 70172
Vitamin B12 - Cyanocobalamin	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	BioChemika>98%	Fluka Nr. 95190

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	EisenII und ManganII: Problematische Komponenten natürlicher Mineral-Rohwässer	8
1.1.1	Aktuelle Methodik zur Entfernung von EisenII und ManganII aus natürlichen Mineral-Rohwässern	10
1.1.2	Rechtliche Hintergründe zur ManganII-Entfernung aus natürlichen Mineral-Rohwässern	11
1.1.3	Grenzen der chemischen Aufarbeitung natürlicher Mineral-Rohwässer	12
1.1.3.1	Technische Probleme bei der chemisch-physikalischen Aufbereitung natürlicher Mineral-Rohwässer	12
1.1.3.2	Die unkontrollierte Nitrifizierung in den Filteranlagen der Mineralwasseraufbereitung	13
1.2	Die natürlich-biologische Entmanganung in der Trinkwasseraufbereitung	13
1.3	Differenzen zwischen Trink- und Mineralwässern	15
1.3.1	Rechtliche Differenzen zwischen Trinkwasser und Mineralwässern	15
1.3.2	Chemisch-physikalische und mikrobielle Differenzen zwischen Trink- und Mineralwässern	17
1.4	Das Ziel einer natürlich-biologischen Entmanganung von Mineralwässern ohne Ozon	18
1.5	Die Bedeutung des Lebensmittels Wasser	19
1.6.	Die Grundlagen (mikro-)biologischer Manganoxidation	19
1.7.	Probleme im Umgang mit manganoxidierenden Mikroorganismen	20
1.8	Zielsetzungen der vorgelegten Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Medien zur Anreicherung, Isolierung und weiteren Untersuchung der manganoxidierenden Mikroorganismen	22
2.1.1	Anzuchtbedingungen für physiologische Versuche in Flüssigmedien	24

2.2	Mikroskopische Untersuchungen.....	24
2.2.1	Fluoreszenzmikroskopie	24
2.2.1.1	Fluoreszenzfärbung mit DAPI.....	25
2.3.	Weitere Färbungen	25
2.3.1	Benzidin-Färbung auf ManganIV	25
2.3.2	Karbofuchsinfärbung.....	25
2.4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	26
2.4.1	Fixierung der Proben	26
2.4.2	Trocknung der Proben und Aufbringen auf die Präparateteller	26
2.5.	Photometrische Messungen	27
2.5.1	ManganII-Bestimmung	27
2.5.1.1	Ablösen von Präzipitaten von festen Oberflächen, insbesondere von Membranfiltern.....	27
2.5.2	Photometrische Bestimmungen von Ammonium, Nitrat und Nitrit.....	28
2.5.3	pH-Messungen.....	29
2.5.4	Redoxpotentialmessungen:	29
2.5.5	Sauerstoffmessungen	29
2.6	Organismenstammhaltung/ Konservierung	30
2.7	Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen	30
2.7.1	Methodik 1 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen - mit Voranreicherung.....	30
2.7.2	Methodik 2 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen - ohne Voranreicherung.....	30
2.7.3	Methodik 3 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen ohne Voranreicherung – Membranfilterverfahren.....	31
2.8.	Methodik des Schicht-Beimpfens von Kleinsäulen-Testanlagen	31
3.	Ergebnisse	33

3.1	Isolierungen manganoxidierender Mikroorganismen.....	33
3.2.	Einordnung der isolierten Mikroorganismen aufgrund morphologischer oder physiologischer Eigenschaften.....	34
3.2.1	Isolat L1 - morphologische und physiologische Eigenschaften.....	34
3.2.2	Isolat R1 - morphologische und physiologische Eigenschaften	36
3.2.3	Isolat R4 - morphologische und physiologische Eigenschaften	36
3.2.4	Isolat D1 - morphologische und physiologische Eigenschaften	37
3.2.5	Isolat Th - morphologische und physiologische Eigenschaften	38
3.2.6	Isolat KIN - morphologische und physiologische Eigenschaften.....	39
3.2.7	Weitere Isolate - Zellmorphologische, in der gängigen Literatur nicht beschriebene Besonderheiten	40
3.2.7.1	Manganoxidierende Hefe mit ausgeprägter EPS-Bildung	40
3.2.7.2	Isolat K1.....	42
3.2.7.3	Isolat W1.....	43
3.3	Vorversuch zum Einsatz nicht-brunneneigener Isolate als Starterkulturen im Testbetrieb zur Entmanganung im Vor-Ort-Grundwasser-Betrieb „Biozentrum“: Nachweis einer natürlichen Metallogenium-Hintergrund-Entmanagnung	45
3.4	Voruntersuchungen zur Physiologie der vorliegenden Isolate: Ausbleibende Manganoxidation im Flüssigmedium.....	49
3.5	Nachweis der Fähigkeit der untersuchten Isolate zur Manganoxidation auf Festmedien durch Rückimpfung	50
3.6	Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien: Diversität der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit von Organik- und ManganII-konzentration	51
3.6.1	Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit vom Organikgehalt im Medium.....	52
3.6.2	Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit von der Mangankonzentration im Medium	54
3.7	Versuche zur photometrischen Quantifizierung der Manganoxidation auf Festmedien.....	57

3.8	Entwicklung von Zweiphasenmedien (flüssig/fest) zur Überwindung der Manganoxidaionshemmung in reinen Flüssigmedien	58
3.9	Physiologische Untersuchungen an manganoxidierenden Bakterien	59
3.9.1	Der Einfluss des pH-Werts auf die Fähigkeit der untersuchten Stämme zur Manganoxidation	60
3.9.1.1	Isolat Th – Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation	61
3.9.1.2	Isolat L1 - Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation	64
3.9.1.3	Isolat R4 – Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation	65
3.9.1.4	Isolat KIN - Der Einfluss des pH-Wertes auf die Manganoxidation	67
3.9.1.5	Isolat D1 - Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation	69
3.9.2	Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	70
3.9.2.1	Isolat Th - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	71
3.9.2.2	Isolat L1 - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	74
3.9.2.3	Isolat R4 – Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	76
3.9.2.4	Isolat KIN – Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	78
3.9.2.5	Isolat D1 - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation	79
3.9.3.	Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	80
3.9.3.1	Isolat Th – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	81
3.9.3.2	Isolat L1 - Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	83
3.9.3.3	Isolat R4 – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	84
3.9.3.4	Isolat KIN – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	86
3.9.3.5	Isolat D1 - Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation	87
3.9.4	Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation.	89
3.9.4.1	Isolat Th – Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation	90
3.9.4.2	Isolat L1 - Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation	92

3.9.4.3	Isolat R4 – Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation	93
3.9.4.4	Isolat KIN - Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation	94
3.9.5	Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation	96
3.9.5.1	Isolat Th - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation.....	97
3.9.5.2	Isolat L1 - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation	100
3.9.5.3	Isolat R4 - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation.....	103
3.9.5.4	Isolat KIN – Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation.....	105
3.9.5.5	Isolat D1 – Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation.....	108
3.9.6	Der Einfluss der KupferII-Konzentration auf die Manganoxidation	110
3.9.6.1	Isolat Th – Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation...	112
3.9.6.2	Isolat L1 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation....	115
3.9.6.3	Isolat R4 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation ...	117
3.9.6.4	Isolat KIN – Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation .	120
3.9.6.5	Isolat D1 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation ..	122
3.9.7	Der Einfluss der ManganII-Konzentration auf die Manganoxidation.....	124
3.9.8	Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation	131
3.9.8.1	Isolat Th – Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation.....	132
3.9.8.2	Isolat L1 – Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation	133
3.9.8.3	Isolat R4 - Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation	135
3.9.8.4	Isolat KIN- Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation.....	137
3.9.8.5	Isolat D1-Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation	139
3.9.9	Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas	141
3.9.9.1	Isolat Th - Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas	142
3.9.9.2	Isolat L1 - Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas	143

3.9.9.3	Isolate R4, KIN und D1- Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas	145
3.9.10	Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation	147
3.9.10.1	Isolat Th – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation.....	148
3.9.10.2	Isolat L1 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation	149
3.9.10.3	Isolat R4 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation.....	151
3.9.10.4	Isolat KIN – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation	152
3.9.10.5	Isolat D1 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation	153
3.9.11	Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation	154
3.9.11.1	Isolate Th und L1 - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation.....	155
3.9.11.2	Isolat R4 - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation .	156
3.9.11.3	Isolat KIN - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation.....	157
3.10	Testfiltrationen zum Einsatz von Starterkulturen für die natürlich-biologische Entmanganung von Trink- und Mineralwässern	158
3.10.1	Testfiltration eines organik- und stickstoffarmen reduzierten Grundwassers (Biozentrum eigener Brunnen)	159
3.10.1.1	Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten Th und L1 als Starterkulturen	160
3.10.1.2	Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten R4 und R1 als Starterkulturen.....	166
3.11.1.3	Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten KIN und D1 als Starterkulturen	169
3.11.3	Testfiltrationen an einem organikreichen und stickstoffreichen, reduzierten Grundwasser (Mineralwasserbetrieb im südlichen Niedersachsen)	170
4.	Diskussion.....	180
4.1	Die lebensmittelrechtliche Problematik von ManganII im Mineralwasser und die Folgen	180

4.2	Entwicklung eines Zweiphasenmediums als Grundlage für physiologische Untersuchungen an manganoxidierenden Mikroorganismen	181
4.3	Die physiologische Diversität der biologischen Manganoxidation und die Konsequenzen für die Anwendung der mikrobiologischen Manganoxidation in der Mineralwasseraufbereitung	183
4.4	Erkenntnisse zum Einfluss weiterer Faktoren auf die Manganoxidation: Der Einfluss von Salinität, Spurenelementen, und Kupfer.....	186
4.5	Die Bedeutung der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) für die Manganoxidation	188
4.6	Konsequenzen aus der physiologischen Diversität für Vorstellungen aus der Artenmannigfaltigkeit bei Manganoxidierern	189
4.7	Mögliche Nutzung der biologischen Manganoxidation mit Starterkulturen auch für schwierige (ammonium- und huminstoffreiche) Mineralwässer	190
5.	Zusammenfassung.....	193
6.	Literatur.....	197

1. Einleitung

1.1 EisenII und ManganII: Problematische Komponenten natürlicher Mineral-Rohwässer

EisenII und ManganII sind in reduzierten Grundwässern nahezu ubiquitär vorhanden. Beide Ionen haben aber in den dort üblichen Konzentrationen kaum toxische Relevanz. EisenII tritt meist in Konzentrationen zwischen 0,1 und 20mg/L auf, in Extremfällen (etwa in den Grubenwässern der Lausitz) kommen Konzentrationen bis 100mg/L vor [KITTNER 1967]. Mangankonzentrationen sind üblich bis etwa 2,5mg/L, seltener bis 10mg/L [SCHWEISFURTH 1976].

Im reduzierten und praktisch sauerstofffreien Zustand sind diese Ionen weitgehend stabil. Erst nach Luftkontakt bilden sich zunächst opaleszente Trübungen und schließlich rotbraune Ausflockungen des dreiwertigen Eisen-Oxidhydrates. Nach einigen Tagen treten oft auch schwarze Verfärbungen auf (ManganIV-Oxidhydrate). ManganII ist wesentlich stabiler in wässriger Lösung, als EisenII.

Ohne biologischen Einfluss ist das Ion bei einer Konzentration von 10mg/L und einem Redoxpotential von +500mV bis zu einem pH-Wert von 7,8-8,0 in wässriger Lösung stabil. Dies liegt zum einen an einer relativ hohen Aktivierungsenergie für die Oxidationsreaktion, zum anderen auch an möglichen Stabilisierungen des Ions durch anorganische Ionen (Chlorid, Sulfat, Hydrogencarbonat) oder organische Komponenten (Aminosäuren oder Huminsäuren) [EHRlich 2000]. Inwieweit diese stabilisierenden Effekte neben der chemischen- auch die natürlich-biologische Manganoxidation hemmen und sich damit auf eine Manganoxidation in Mineralwässern auswirken können, gilt es zu klären.

EisenII und auch ManganII müssen aus Trink- und Mineralwasser vor der Abgabe an den Verbraucher nahezu quantitativ entfernt werden, denn rotbraune Ausflockungen und Verfärbungen gelten sowohl im Trink- als auch im Mineralwasser als erheblicher Mangel und machen die Lebensmittel aufgrund optischer Beeinträchtigungen und ihres metallischen Geschmacks ungenießbar. Dies

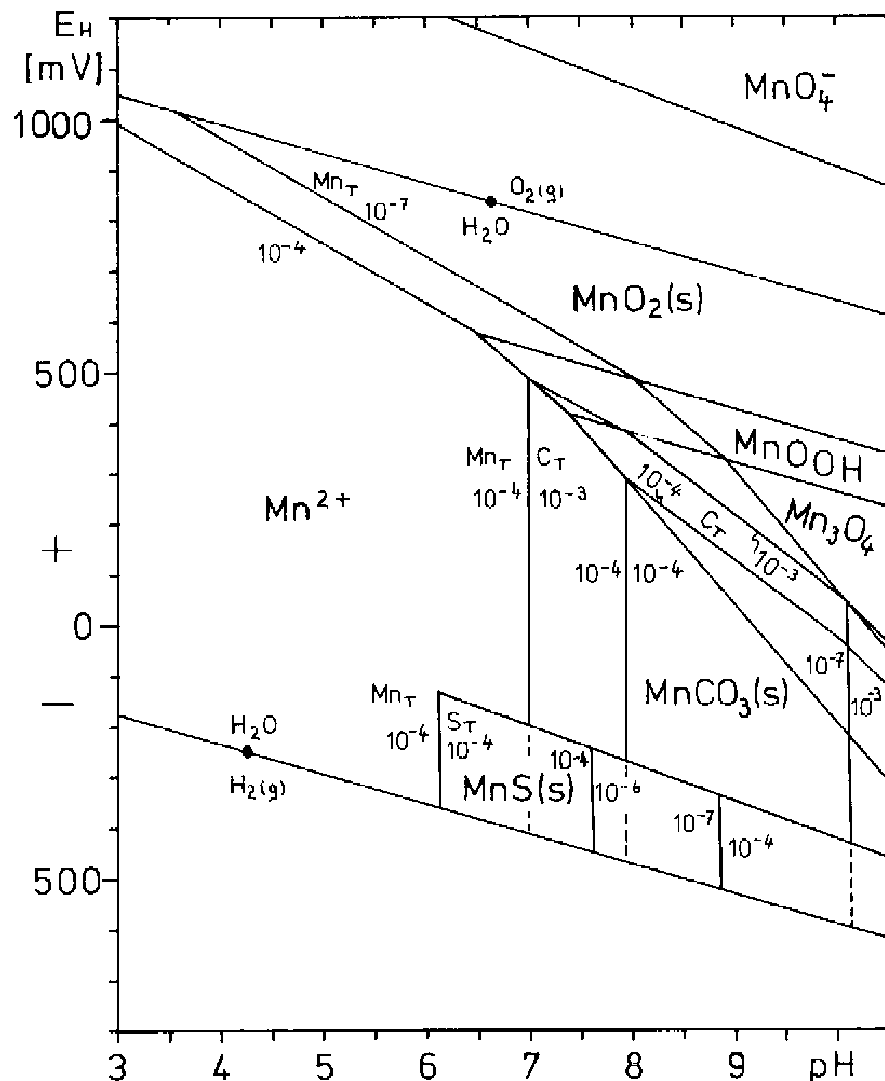


Abb. 1 Eh-pH-Diagramm System Mn – H₂O – CO₂ – H₂S; Mn_T = 10⁻⁴ – 10⁻⁷ mol/L, C_T = 10⁻³ – 10⁻⁴ mol/L; S_T = 10⁻⁴ – 10⁻⁸ mol/L; pO₂ = 0,21 bar (abs.); 25°C [HEM 1963]

ergibt sich aus **§17 (1) Nr. 2b des LMBG**, wonach es verboten ist, Lebensmittel, die „hinsichtlich ihrer Beschaffenheit von der Verkehrsauffassung abweichen und dadurch in ihrem Wert, insbesondere in ihrem Nähr- und Genusswert oder in ihrer Brauchbarkeit nicht unerheblich gemindert sind (...) ohne ausreichende Kenntlichmachung in den Verkehr zu bringen.“

Neben optischen, geschmacklichen und rechtlichen Auswirkungen **bereiten Eisen II und ManganII auch technisch erhebliche Probleme**. Bei Nichtentfernung setzen sich Rohleitungen mit EisenIII-oxid-Hydraten und/oder ManganIV-oxid-Hydraten zu, Abfüllanlagen können verstopfen und verhindern einen reibungslosen

Ablauf betrieblicher Vorgänge. Es gelten für beide Ionen im Trinkwasser strenge Grenzwerte (FeII: 0,2mg/L / MnII: 0,05 mg/L).

ManganII gilt als essentiell – der Bedarf wird aber durch die tagesübliche Zufuhr von 2-48mg mit der Nahrung gedeckt. Mangan ist u.a. Bestandteil der Pyruvatcarboxylase und aktiviert - ebenso wie andere zweiwertige Metallionen - verschiedene Enzyme, z.B. die Isocitronensäure-Dehydrogenase [BELITZ/GROSCH 1992].

Eisen ist Bestandteil von Hämoglobin und Myoglobin, sowie einer Reihe von Enzymen (z.B. Katalase, Peroxidase) [BELITZ/GROSCH 1992].

1.1.1 Aktuelle Methodik zur Entfernung von EisenII und ManganII aus natürlichen Mineral-Rohwässern

Zur Entfernung von Eisen und ManganII aus Mineral-Rohwässern werden die Wässer nach der Förderung (oft unter Druck) belüftet und die sich abscheidenden EisenIII-Oxid-Hydrate über Kiesfilter abgeschieden. Dabei bleibt oft ein geringer Anteil Eisen, z.B. kolloidal gelöst oder an Huminsäuren komplex gebunden im Wasser zurück [EHRlich 2000]. **Zusammen mit dem ManganII wird dieses verbliebene EisenII durch ozonangereichertes Wasser zum unlöslichen Oxid chemisch oxidiert** und ebenfalls über Kiesfilter abgetrennt. Überschüssiges Ozon wird anschließend über Aktivkohlefilter entfernt.

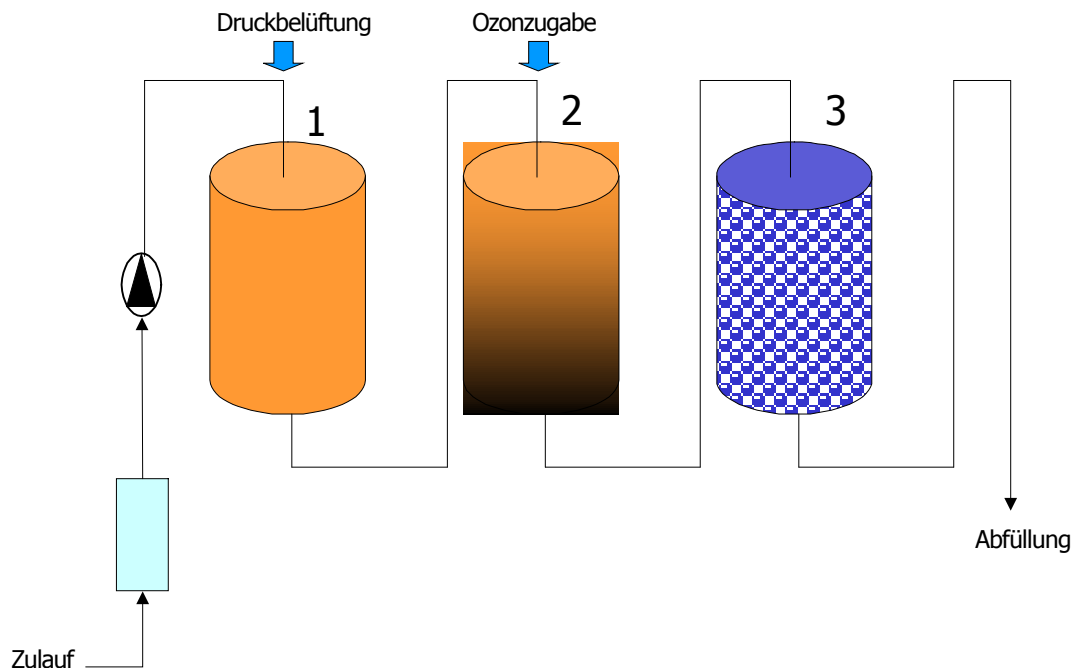


Abb. 2 Schematische Darstellung einer bislang gängigen Aufarbeitungsanlage zur Entfernung von EisenII und ManganII aus Mineral-Rohwässern

1 – Kiesbettfilter zur Enteisung nach Belüftung unter Druck

2 – Oxidation des in Lösung verbliebenen FeII sowie des MnII durch die Zugabe von ozonangereicherter Luft

3 – Aktivkohlefilter zur Entfernung überschüssigen Ozons

1.1.2 Rechtliche Hintergründe zur ManganII-Entfernung aus natürlichen Mineral-Rohwässern

Der Einsatz von Ozon deckt sich nicht direkt mit den Vorgaben der alten Mineral- und Tafelwasserverordnung (MTV). Da bei Verzicht auf Ozon eine quantitative EisenII und ManganII-Entfernung auf dem nicht-biologischen Weg nicht möglich wäre, kommt Ozon unter den Definition der „**aktivierten Luft**“ oder der „**entkeimten Luft**“ zum Einsatz. Eine gesundheitliche negative Beeinflussung durch mit Ozon behandeltes Wasser wurde bislang ausgeschlossen. **Die Ozonbehandlung wurde daher von den Überwachungsbehörden über Jahre toleriert.**

In den letzten Jahren wurde jedoch die Bildung von Bromat und Trihalogenmethanen, insbesondere des Bromoform zunehmend problematisiert. Beiden Stoffen bzw. Stoffgruppen werden cancerogene Eigenschaften zugeschrieben. Daher wurden Grenzwerte eingeführt (Bromat: 3µg/L bzw. Bromoform: 1µg/L) [GROHMANN/HÄSSLBARTH 2003].

Die Kommission der Europäischen Union hat in der **Richtlinie 96/70/EG** die Ozonbehandlung von natürlichem Mineralwasser explizit als offizielles Verfahren zur Entfernung von EisenII und ManganII zugelassen. Diese Zulassung ist allerdings für mineralwasserproduzierende Betriebe mit dem Nachteil behaftet, dass sie **deklarierungspflichtig** ist.

Der Begriff „Ozon“ oder „ozonbehandelt“ sind in unserer Gesellschaft deutlich negativ besetzt durch Begriffe wie „Ozonalarm“ oder „Ozonloch“ und hätten mit großer Sicherheit eine ablehnende Haltung des Verbrauchers zur Folge.

In der Richtlinie 2003/40/EG der Kommission der Europäischen Union vom 16. Mai 2003 wird **ab 2006 ein Grenzwert für ManganII im Mineralwasser von 0,5mg/L festgelegt.**

1.1.3 Grenzen der chemischen Aufarbeitung natürlicher Mineral-Rohwässer

1.1.3.1 Technische Probleme bei der chemisch-physikalischen Aufbereitung natürlicher Mineral-Rohwässer

Ein Problem bei der kombinierten Luft-Ozon-Behandlung ist die **fehlende Raumfilterwirkung**. Die Abscheidung der EisenIII-, bzw. der ManganIV-oxid-Hydrate erfolgt nicht in der ganzen Tiefe des Filters, sondern nur in den ersten 10-20% der Filterhöhe. Dies führt bei einer entsprechenden Eisen- und Manganlast im Wasser zu **sehr kurzen Filterlaufzeiten**, die zum Teil **täglich von Rückspülvorgängen unterbrochen** werden müssen. Auch das sich häufig wiederholende Rückspülen trägt zur **Kostenintensivierung der Mineralwasser-aufbereitung** bei.

1.1.3.2 Die unkontrollierte Nitrifizierung in den Filteranlagen der Mineralwasseraufbereitung

Der Einsatz von Starterkulturen für die Entmanganung ist auch aus einem anderen Grund von außerordentlicher Wichtigkeit. Im Rahmen der zur Zeit gängigen Technik der kombinierten Luft-Ozon-Behandlung zur Aufbereitung von Mineralwässern, treten bei erhöhten Ammoniumkonzentrationen im Rohwasser **Probleme mit toxikologisch und rechtlich problematisch hohen Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Reinwasser** auf (vgl. 1.3.1).

Die (mikrobielle) Oxidation von Ammonium zu Nitrit bzw. von Nitrit zu Nitrat zwingt die Mineralwasserproduzenten zu drastischen Maßnahmen. Die entsprechenden **Anlagenteile (insbesondere die Aktivkohleeinheit) werden über mehrere Stunden auf Temperaturen von über 80°C erhitzt**, um vor allem Bakterien der Nitroso-Gruppe auszuschalten. Diese regelmäßig wiederkehrende Maßnahme – in einigen Betrieben ist das Erhitzen **mehrmals pro Woche** notwendig (!) – verursacht Kosten und Produktionsverzögerungen. Für die Mineralwasserproduzenten ist eine Umstellung ihrer Prozessführung auf die natürlich-biologische Variante nur mit der „Sicherheit“ von Starterkulturen denkbar. Nach einer möglichen Zerstörung der natürlichen Mikroflora im manganoxidierenden Filterbereich durch Erhitzen, aber auch nach einem Phagenbefall muss die Entmanganung umgehend, möglichst nach wenigen Stunden, wieder in Betrieb gehen können. Lange Wartezeiten wären hier inakzeptabel.

1.2 Die natürlich-biologische Entmanganung in der Trinkwasseraufbereitung

Bereits im 19. Jahrhundert stellt Winogradsky [ÜBERSICHT BEI CHOLDONY 1926] heraus, dass die Ausflockungen in belüfteten Grundwässern zu großen Teilen auf biologische Einflüsse zurückzuführen seien.

Die systematische Entfernung von EisenII und ManganII wird seit Jahrzehnten betrieben. Nach dem Zweiten Weltkrieg wurden die Ionen aber zumeist durch eine

chemische Oxidation mittels pH-Wert-Steigerung und anschließende Filtration entfernt. Doch bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde begonnen, **die Mikroorganismen**, die für die unerwünschten Ausflockungen verantwortlich sind, **gezielt für die EisenII- und/oder die ManganII-Entfernung in Kiesfiltern** (Festbettreaktoren) oder in unterirdischen Filtrationseinheiten [KAISERL. PATENTAMT 1900] **einzusetzen**. Während Piefke/Rieseler im 19. Jahrhundert noch die EisenII- und ManganII-Entfernungen in Langsamsandfiltern zur technischen Umsetzung brachten, übernahmen z.B. Fuller und Wellmann die gewonnenen Erkenntnisse für die Schnellfiltration [Eine Übersicht über frühe Arbeiten zur Enteisung und Entmanganung geben HÄSSELBARTH UND LÜDEMANN (1971)]. Ein spezifisch-biologisches Verfahren zur Entmanganung wurde bereits vor dem Ersten Weltkrieg von Vollmar [eine Übersicht gibt BEGER 1938] mit beimpftem Braunstein-Kies entwickelt.

Die Eisenoxidation in Festbettreaktoren läuft nach Belüften bereits nach wenigen Tagen an und ist dann meist als quantitativ zu betrachten. Bei guter Prozessführung kann ein solcher Filter über Jahre betrieben werden. Als einziger Eingriff ist gelegentliches Rückspülen des Filters notwendig um ein Zusetzen des Reaktors zu verhindern und totes biologisches Material aus dem Filter auszuschwemmen [MOUCHET 1992, HÄSSELBARTH/LÜDEMANN 1971].

In der Regel sind derartige Festbettreaktoren zweistufig konzipiert. Hierbei wird im Idealfall das EisenII im ersten und das ManganII im zweiten Filterabschnitt eliminiert. **Die Einarbeitungszeit** für diesen zweiten Filterabschnitt ist allerdings nicht mit derjenigen für die Eisenoxidationsstufe vergleichbar. Mikroorganismen, die **eine quantitative Entfernung des gelösten ManganII aus dem Wasser** bewerkstelligen, siedeln sich oft **erst nach vielen Wochen und Monaten in ausreichender Zahl** an [RÜGER / WEIDNER 1980]. Als Grund hierfür wird u.a. die Rückhaltung der manganoxidierenden Mikroorganismen im Eisenabscheidungsfilter vermutet. Auch hier kann der Filter nach der Einarbeitung über Jahre bei gelegentlichem Rückspülen genutzt werden.

Eine Verkürzung dieser Einarbeitungszeit kann durch den Einsatz bereits eingefahrenen Materials aus anderen Trinkwasseraufbereitungsanlagen erreicht werden [U.A. GAGE ET AL. 2001, RÜGER/WEIDNER 1980].

Die natürlich-biologische Aufbereitung von Trinkwasser ist bereits seit Jahrzehnten etabliert. Die Technik läuft meist störungsfrei. Bei einer denkbaren, aber nicht zu erwartenden Überschreitung von Grenzwerten steht bei der Trinkwasseraufbereitung aber auch eine ganze Reihe chemischer Behandlungsmethoden zur Auswahl, die für die Mineralwasseraufbereitung nicht zugelassen sind (Flockungsmittel, pH-regulierende Substanzen, Fällungsreagenzien).

Die natürlich-biologische Entmanganung kommt in der Regel ohne diese zusätzlichen Mittel aus. Neben dem **geringeren Chemikalienverbrauch** und **geringeren Wartungskosten** ist auch ein **geringerer Schlammwasseranteil** zu erwarten, da die durch Mikroorganismen entstandenen Oxid-Hydrate oft durch eine andere Kristallstruktur dichter gepackt sind. Dies führt auch bei der Schlammentsorgung zu Einsparungen [HÄSSELBARTH / LÜDEMANN 1971].

1.3 Differenzen zwischen Trink- und Mineralwässern

1.3.1 Rechtliche Differenzen zwischen Trinkwasser und Mineralwässern

Natürliches Mineralwasser ist im §2 der MTV definiert. Demnach ist natürliches Mineralwasser ein Wasser, das unter anderem folgenden Ansprüchen genügt:

1. Es hat seinen Ursprung in unterirdischen, vor Verunreinigungen geschützten Wasservorkommen (...).
2. Es ist von ursprünglicher Reinheit und gekennzeichnet durch seinen Gehalt an Mineralien, Spurenelementen oder sonstigen Bestandteilen und gegebenenfalls durch bestimmte, insbesondere ernährungsphysiologische Wirkungen.

Gemäß §3 der MTV darf Mineralwasser gewerbsmäßig nur in den Verkehr gebracht werden, wenn es amtlich anerkannt ist.

Die zur Aufbereitung von Mineralwasser zulässigen Verfahren sind im §6 der MTV dargelegt: Demnach **dürfen nur folgende Aufbereitungsverfahren für Mineralwässer angewandt werden:**

1. Abtrennen bestimmter natürlicher Inhaltsstoffe, wie Eisen- oder Schwefelverbindungen, durch Filtration oder Dekantation, gegebenenfalls nach Belüftung, sofern die Zusammensetzung des natürlichen Mineralwassers durch dieses Verfahren (...) nicht geändert wird.
2. Entzug von Kohlenstoffdioxid durch physikalische Verfahren.
3. Versetzen oder Wiederversetzen mit Kohlenstoffdioxid.

Es dürfen keine Maßnahmen angewandt werden, die den Keimgehalt des Mineralwassers verändern.

Gemäß §9 (3) der MTV müssen bei Auslobung bestimmter Eigenschaften die in Anlage4 der MTV genannten Angaben genutzt und die ebenfalls dort genannten Anforderungen eingehalten werden.

In diesem Anhang der MTV ist die Angabe: **„geeignet für die Zubereitung von Säuglingsnahrung“ von entscheidender Bedeutung für die mineralwasserproduzierenden Betriebe**, da diese Auslobung einen deutlichen Wettbewerbsvorteil darstellen kann. Hier sind unter anderem folgende Richtwerte aufgeführt:

Natrium	< 20mg/L
Nitrat	< 10 mg/L
Nitrit	< 0,02 mg/L
Mangan	< 0,05 mg/L

Mineralwasser wird im §2 MTV u.a. definiert als ein Wasser von „ursprünglicher Reinheit“. Dies führt dazu, dass diese Wässer möglichst wenig Manipulation erfahren sollen und möglichst unverändert in ihren physikalisch-chemischen, sowie den biologischen Eigenschaften an den Verbraucher abgegeben werden sollen. Ein Einsatz ortsfremder Mikroorganismen schließt sich damit aus.

Der Begriff des Trinkwassers ist wesentlich weiter gefasst. Trinkwasser ist gemäß §3 der TWV „... alles Wasser im ursprünglichen Zustand oder nach Aufbereitung, das zum Trinken, zum Kochen, zur Zubereitung von Speisen und Getränken (...) bestimmt ist.“ Die Aufbereitungsmöglichkeiten für Trinkwasser sind in den §§ 11 und 12 der TWV geregelt. Die Liste mit den zur Aufbereitung von Trinkwasser zugelassenen Stoffen wird gemäß §11 (1) und (2) TWV vom zuständigen Ministerium bekannt gegeben und vom Umweltbundesamt geführt.

1.3.2 Chemisch-physikalische und mikrobielle Differenzen zwischen Trink- und Mineralwässern

Trink- und Mineralwässer unterscheiden sich nicht nur rechtlich, sie haben oft auch eine deutlich differente Charakteristik. So ist der Salzgehalt im Mineralwasser oft deutlich höher, als im Trinkwasser, wo ein hoher Gehalt bestimmter Ionen (z.B. Calcium oder Magnesium) oft durch Fällungen oder Mischen mit salzärmeren Wässern bewusst reduziert wird. Die Förderung von Mineralwässern aus großen Tiefen, in denen die Wässer unter erheblichem Druck stehen können, bringt oft eine hohe Konzentration von Hydrogencarbonat mit sich, welches zur Erniedrigung des pH-Wertes führt. Dies könnte gravierende Folgen für die Manganoxidation haben (vgl. Abb.1).

Der Gehalt an Spurenelementen kann sich deutlich von Trinkwasser unterscheiden. Auch die Temperatur ist in diesen Tiefenwässern oft höher (bis 20°C) als in „normalen“ Grundwasserleitern (ca. 8°C). Es sind einige Mineralwässer im Handel, die im Rohzustand nicht unerhebliche Mengen organischen Materials in sich tragen. Diese Wässer kommen oft aus ursprünglich mooriger Gegend und weisen im Rohzustand die für Huminstoffe typisch gelbliche Färbung auf. Auch die Huminstoffe könnten z.B. durch Komplexbildungen auf die natürlich-biologische Entmanganung Einfluss nehmen.

Hinzu kommen Zweifel, ob in Tiefen, aus denen Mineralwasser oft gefördert wird, natürlicherweise überhaupt manganoxidierende Mikroorganismen vorkommen.

1.4 Das Ziel einer natürlich-biologischen Entmanganung von Mineralwässern ohne Ozon

Ein Einsatz von Mikroorganismen zur natürlich-biologischen Entmanganung ist nur unter der Voraussetzung denkbar, die Ansiedelung der natürlich vorhandenen Mikroflora zu ermöglichen. Dies würde allerdings Wartezeiten von mehreren Monaten bis zur stabilen Entfernung des ManganII nach sich ziehen [RÜGER/WEIDNER 1980]. Der einzige betriebswirtschaftlich sinnvolle Weg zur schnellen Umsetzung einer natürlich-biologischen Entmanganung in der Mineralwasseraufbereitung liegt daher im **Einsatz von Starterkulturen**.

Um der rechtlichen Voraussetzung der „ursprünglichen Reinheit“ der Mineralwässer Rechnung zu tragen, sollten die Starterkulturen **möglichst brunneneigen**, das heißt aus dem zu reinigenden Brunnenwasser direkt isoliert sein.

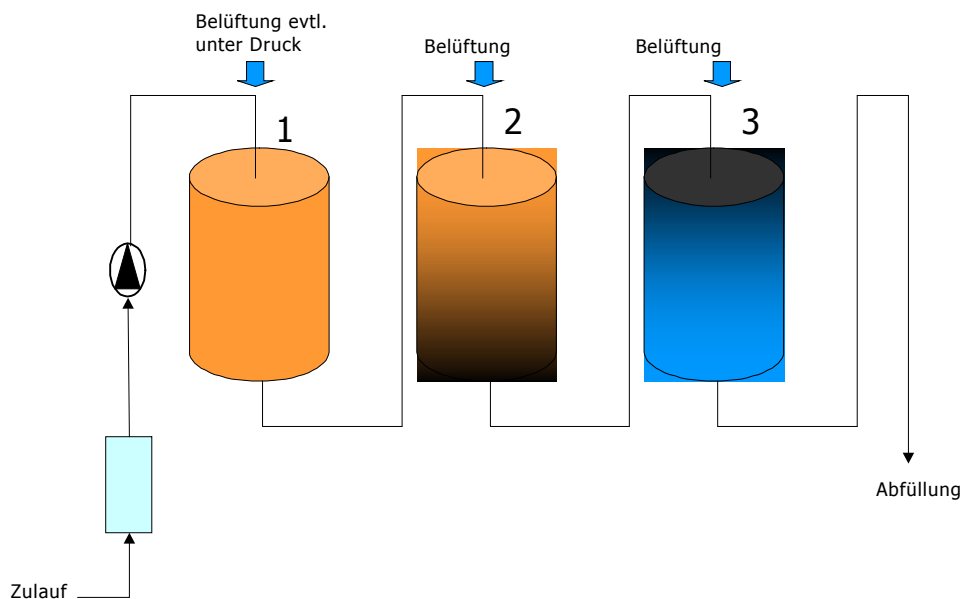


Abb. 2a Schematische Darstellung einer geplanten Aufarbeitung zur Entfernung von EisenII und ManganII aus Mineral-Rohwässern ohne Einsatz von Ozon als Oxidationsmittel

- 1 – Kiesbettfilter zur Enteisenung nach Belüftung (evtl. unter Druck)
- 2 – Oxidation des in Lösung verbliebenen EisenII nach weiterer Belüftung und bei Bedarf Umsetzung anorganischer Stickstoffverbindungen zum Nitrat (Nitrifikations-Biofilter)
- 3 – Mit einer Starterkultur beimpfter Festbettreaktor zur Entfernung von gelöstem MnII (Entmanganungs-Bioreaktor)

1.5 Die Bedeutung des Lebensmittels Wasser

Wasser ist das wichtigste Lebensmittel des Menschen. Im Durchschnitt verbraucht jeder Deutsche pro Tag ca. 127 Liter. Davon werden ca. 6% für die Zubereitung von Speisen und Getränken oder den direkten Verzehr verwandt. Etwa 2/3 des in Deutschland genutzten Trinkwassers kommt dabei aus Grundwasserleitern, der Rest aus oberirdischen Vorkommen [BGW 2004].

Jeder Bundesbürger hat 2003 im Schnitt 129 Liter Mineral- oder Heilwasser konsumiert. Der Mineralwassermarkt in Deutschland hat 2003 über 3 Mrd.€ umgesetzt und es sind insgesamt 12,75 Mrd. Liter Mineralwasser oder mineralwasserhaltige Getränke an die Verbraucher verkauft worden (Branchendaten des Verbandes Deutscher Mineralbrunnen e.V.). **Mineralwasser ist** daher auch ein **bedeutender wirtschaftlicher Faktor** und jede Kostenersparnis im Produktionsablauf ist ein **Wettbewerbsvorteil** gegenüber in- und ausländischer Konkurrenz, sowie den Herstellern von Tafelwässern.

1.6. Die Grundlagen (mikro-)biologischer Manganoxidation

Manganoxidierende Mikroorganismen kommen in ihrem natürlichen Habitat oft vergesellschaftet vor. Sie sind **ubiquitär verbreitet** und sowohl in Grund-, wie auch in Oberflächengewässern gefunden worden [z.B. CHOLODNY 1926, SCHWEISFURTH 1973f]. Ihr Vorkommen erstreckt sich sowohl auf den limnischen, als auch auf den marinen Bereich [DEVIRIND ET AL. 1986, ARCURI ET AL. 1980]. Aber auch in Böden, im Gewässerschlamm und in Erzminen [EHRlich 2001] wurden manganoxidierende Mikroorganismen gefunden. Meist handelt es sich dabei um bakterielle Manganoxidierer, jedoch sind auch einige manganoxidierende Hyphenpilze bekannt [SCHWEISFURTH 1971, 1972 UND EHRlich 2000].

Manganoxidierende Bakterien [eine Übersicht gibt GHIOSE 1984] lassen sich morphologisch in zwei große Gruppen einteilen:

1. Scheidenbildende Bakterien:

Hierzu zählt vor allem die **Gattung Leptothrix** mit dem wohl am besten untersuchten scheidenbildenden Manganoxidierer *Leptothrix discophora* [z.B. SPRING 2000 UND BOOGERT ET AL. 1987]. Weitere Vertreter dieser wichtigen Gattung sind *L. ochracea* und *L. lopholea* [SPRING 2002].

2. Kapselbildende Stäbchen und Kokken:

Zu den kapselbildenden manganoxidierenden Stäbchen und Kokken werden hauptsächlich folgende Gattungen gezählt:

Siderocapsa, *Siderococcus*, *Naumanniella*, *Ochrobium* sowie einige Arten aus der *Pseudomonas* Gruppe (z.B. *P. manganoxidans*, *P. putida*, *P. fluorescens*)

Die technische Bedeutung der **Hyphenpilze** bei der natürlich-biologischen Entmanganung von Trink- und Mineralwässern scheint eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Ähnliches gilt für ***Metallogenium personatum***, ein noch nicht isolierter Mikroorganismus, der als Gradientenorganismus in Seen, aber auch in Grundwässern vorkommt [SCHMIDT 1979, 1984a UND 1984b].

Zu den **knospenden** Manganoxidierern werden ***Pedomicrobium*** [LARSEN ET AL. 1999] und ***Hyphomicrobium*** [TYLER ET AL. 1967] gezählt.

Die Manganoxidation kann von den einzelnen Stämmen sowohl enzymatisch, als auch nichtenzymatisch vollzogen werden. Bei einer Reihe von manganoxidierenden Organismen ist der Mechanismus noch völlig unklar. Die bislang physiologisch untersuchten Manganoxidierer sind strikt aerob oder microaerophil und besitzen einen heterotrophen oder mixotrophen Stoffwechsel [EHRlich 2000].

1.7. Probleme im Umgang mit manganoxidierenden Mikroorganismen

Sowohl für Chlamydobakterien, als auch Kapselbildner gilt, dass ihre taxonomische Einordnung bislang hauptsächlich aufgrund morphologischer Kriterien erfolgt. Ihre

Untersuchung bezog sich in der Vergangenheit entweder auf ihren technischen Nutzen [SCHMIDT 1979, MOUCHET 1992] oder auf die Identifizierung der für die Manganoxidation verantwortlichen genetischen Sequenzen bzw. der entsprechenden Proteine [ADAMS/GHIOSE 1987, EMERSON/GHIOSE 1992, ZINDULUS ET AL. 1983]. Die Zuordnung der einzelnen in ihrem natürlichen Habitat aufzufindenden Gattungen und Arten scheitert in der Regel an **fehlenden Reinkulturen**. Die aufwändige Anreicherung und Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen hat bislang auch verhindert, durch physiologische Untersuchungen Zusammenhänge zwischen Umweltbedingungen und Problemen bei der technischen Umsetzung der Manganoxidation aufzeigen zu können. Aber gerade das Wissen um die physiologischen Grundlagen der zu untersuchenden Mikroorganismen könnte entscheidend bei der technischen Nutzung der Bakterien oder Pilze helfen.

1.8 Zielsetzungen der vorgelegten Arbeit

1. Untersuchung verschiedener Standorte auf das Vorkommen manganoxidierender Mikroorganismen u.a. in Mineralbrunnen-Quellen.
2. Isolierung von Reinkulturen manganoxidierender Mikroorganismen.
3. Physiologische Untersuchung der Isolate. Auswahl einiger Isolate, die sich als Starterkulturen für die natürlich-biologische Entmanganung von Trink- und Mineralwässern eignen könnten.

Hierzu gehört vor allem die Untersuchung ausgewählter Isolate bezüglich ihrer Abhängigkeiten von Temperatur, Organik, Sauerstoffgehalt, Salinität, und weiterer Parameter).

4. Einsatz ausgewählter Isolate im Testbetrieb mit unterschiedlichen wasser-chemischen Parametern.

2. Material und Methoden

2.1 Medien zur Anreicherung, Isolierung und weiteren Untersuchung der manganoxidierenden Mikroorganismen

Den genutzten Medien wurde bei Bedarf 12-15g Agar zugegeben. Die Sterilisation erfolgte stets im Autoklav für 20 Minuten bei 121°C (1 bar Überdruck)

1. Sid A - Medium (modifiziert nach Pringsheim [PRINGSHEIM 1949])

Hefeextrakt	50 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	30 mg
Leitungswasser	ad 1000 mL
pH-Wert	7,0

2. LX1 [SIERING/GHIORSE 1996]

Pepton	0,25g
Trypticase	0,25g
Hefeextrakt	0,5g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,6g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	70mg
HEPES	2,38g
Aqua deion.	ad 1000mL

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Es werden steril zugegeben:

Na-Pyruvat	1,0 g
FeSO ₄	3 mg
MnSO ₄ H ₂ O	9mg
Vitamin B12	5µg

Das Medium LX1 dient in flüssiger Form auch als Anzuchtmedium scheidenbildender Manganoxidierer für den Einsatz in Testfiltrationen (vgl. 3.10.).

3. LX2 [SPRING ET AL. 1996]

Hefeextrakt	1,0g
Pepton	1,5g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	50mg
Eisen-Ammonium-Citrat	0,5g
MnSO ₄ · H ₂ O	50mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	10mg
Leitungswasser	ad 1000mL

Der pH-Wert wird mit NaOH (1mol/L) auf 7,1 eingestellt.

4. Mn2-Medium [MULDER/VAN VEEN 1964]

Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,15g
MnCO ₃	2,0g
Fleischextrakt	0,1g
Hefeextrakt	0,075g
Tri-Natrium-citrat	0,15g
Leitungswasser	ad 1000mL

Der pH-Wert beträgt ca. 7,3 und muss nicht weiter eingestellt werden. Nach dem Autoklavieren werden 5µg Cyanocobalamin (Vit. B12) steril zugegeben.

5. Mn4-Medium [MULDER/VAN VEEN 1964]

MnCO ₃	1,0g
Hefeextrakt	0,075g
Aqua dest.	Ad 1000mL

Der pH-Wert beträgt 7,3 und wird nicht weiter eingestellt. Nach dem Autoklavieren werden 5µg Cyanocobalamin (Vit.B12) steril zugegeben.

6. Mineralsalzmedium [NÄVEKE/TEPPER 1979]

(NH ₄)SO ₄	0,66g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,10g
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,017g
KH ₂ PO ₄	0,05g
HEPES	2,38g
Glucose	0,5g
MnSO ₄ · H ₂ O	150mg
Wasser(bidest.)	ad 1000mL
pH-Wert	7,0

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt mit NaOH (1 mol/L).

7. Flüssigmedium zur Anzucht kapselbildender Mikroorganismen zum Einsatz in Testfiltern

Hefeextrakt	250mg
HEPES	2,38 g/L
Leitungswasser	ad 1000mL

Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt

8. Basismedium (flüssig) für physiologische Untersuchungen manganoxidierender Mikroorganismen (mod. nach Pringsheim [PRINGSHEIM 1949])

Hefeextrakt	50mg
HEPES	2,38 g
MnSO ₄ · H ₂ O	30mg
Cyanocobalamin	5µg

Agar	1 g
Leitungswasser	ad 1000mL

Der pH-Wert wird auf 6,8–7,1 eingestellt, Mangansulfat und VitaminB12 werden erst nach der Sterilisation steril zugegeben.

2.1.1 Anzuchtbedingungen für physiologische Versuche in Flüssigmedien

Die Zellen werden für 5d bei 25°C aerob, dunkel, auf folgenden Festmedien inkubiert:

Die Isolate KIN und D1 werden auf dem verfestigten Medium 7 und die Isolate Th, L1 und R4 auf Festmedium LX1 angezogen. Beide Anreicherungsmedien werden **ohne EisenII oder ManganII-Salze** angesetzt. Die Zellen werden mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) von den Festmedien abgeschwemmt und die Zellzahl durch Auszählen in der Thoma-Kammer bestimmt. Für die Isolate L1, Th und R4 kann die Zellzahl nur annäherungsweise bestimmt werden, da die Leptothrix-Stämme durch Ketten und Scheidenbildung dazu neigen, zu verklumpen und Flocken auszubilden, die sich auch durch intensives Schütteln oder Behandlung mit Ultraschall nicht auflösen lassen. Zur Einbeziehung der in Flocken gebundenen Zellen wurden kleinere, übersichtliche Flocken einer bestimmten Größe ausgezählt und deren Zellzahl auf Flocken anderer Größe bezogen.

2.2 Mikroskopische Untersuchungen

2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fixierung der Zellen wird die Probensuspension auf Objektträgern zunächst luftgetrocknet und anschließend hitzefixiert [NÄVEKE, TEPPER 1979].

Geräteparameter:

Mikroskop: Zeiss, Axioplan mit Objektiven des Typs Plan-Neofluar

Filtersatz: DAPI: UVH 365 Nr. 487901 (Fa. Zeiss)

Lichtquelle: HBO 50W-Quecksilberhochdrucklampe Fa. Osram

2.2.1.1 Fluoreszenzfärbung mit DAPI

Färbelösung: 1 mg 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)
gelöst in 100 mL Wasser (deion.).

Die Färbelösung ist bei –18°C mehrere Wochen haltbar.

Die luftgetrockneten und hitzefixierten Proben werden mit Färbelösung überschichtet und ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung vorsichtig (!) mit Wasser (deion.) abgespült, bei Raumtemperatur im Dunklen getrocknet und die Präparate mikroskopisch betrachtet [CZEKALLA 1988].

2.3. Weitere Färbungen

2.3.1 Benzidin-Färbung auf ManganIV

Färbelösung: 0,5% Benzidin in 10%iger Essigsäure.

Die Lösung ist bei Raumtemperatur mehrere Monate haltbar.

Das zu untersuchende Material wird mit einem Tropfen Benzidin-Lösung benetzt. Bei positivem Ergebnis ergibt sich in wenigen Sekunden eine kräftig-blaue Verfärbung.

Für mikroskopische Färbungen wird das Präparat mit einem Deckglas bedeckt, an dessen Rand ein Tropfen Benzidin-Lösung gegeben wird. Anschließend wird das Färbereagenz mit einem Stück Filterpapier durch das Präparat gezogen und die Probe zügig mikroskopiert, da die Färbelösung nach kurzer Zeit Manganoxide löst [HACKL 1962].

2.3.2 Karbolfuchsinfärbung

Färbelösung:

Lösung 1:	Fuchsinstammlösung (ca. 8,2g/100mL Ethanol (96%))	10mL
Lösung 2:	Phenol	5g
	Wasser (deion.)	100mL

Das Phenol wird im lauwarmen Wasser gelöst (evtl. unter weiterer Wärmezufuhr oder im Ultraschallbad).

Die Lösungen 1 und 2 werden gemischt und als Stammlösung verwendet. Für die Färbungen wird die Stammlösung mit Wasser (deion.) 1:10 (kräftige Färbung) oder 1:100 (hellere Färbung) gemischt [BAST 1999].

2.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.4.1 Fixierung der Proben

Zur chemischen Fixierung des Probenmaterials wird dieses für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 8°C in eine 2%ige Lösung von Glutardiadehyd in Sørensen-Puffer (0,1 mol/L, pH 7,0) gegeben[CZEKALLA 1988].

Sørensen-Puffer (0,1 mol/L):

Lösung A: 0,1 mol/L KH_2PO_4

Lösung B: 0,1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Puffer: Für den gewünschten pH-Wert von 7,0 werden
39,2 mL Lösung A und
60,8 mL Lösung B vermischt.

2.4.2 Trocknung der Proben und Aufbringen auf die Präparateteller

Nach der Fixierung werden die Präparate in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert - je 20 Minuten bei folgenden Konzentrationen (v/v): 20%, 40%, 60%, 80%, 2x 100%. Zur anschließenden Acetonentfernung werden die Proben zunächst in Hexamethyldisilazan (HDMS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend an der Luft für 48h getrocknet. Bis zur weiteren Bearbeitung werden die Proben im Exsiccator gelagert. Werden nicht-acetonresistente Membranfilter

verwandt, so wird zur Entwässerung Isopropanol genutzt [GIAMMARA ET AL. 1987, MODIFIZIERT].

Nach der Trocknung wird das Probenmaterial mit doppelseitig klebendem leitfähigen Klebeband (Plano Nr.G3939) auf in Aceton (100%) entfettete Aluminium-Stiftprobenteller (Plano Nr.G301) geklebt. Bei Bedarf wurden die Probenränder mit Leitsilber (Plano Nr.G302) bestrichen.

Die Besputterung mit Gold erfolgte in einer Sputteranlage der Fa. Balzers (heute: „BAL-TEC“) SCD 040 mit Argon als Betriebsgas, einer Arbeitsspannung von ca. 75mA und einer Sputterzeit von ca. 70 Sekunden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem Gerät der Firma Philips (SEM 515).

2.5. Photometrische Messungen

2.5.1 ManganII-Bestimmung

Die Manganbestimmungen in wässrigen Lösungen erfolgten durch photometrische Bestimmung mittels Kolorimetrie des rotbraunen Farbkomplexes mit Formaldioxim (Testsatz der Fa. Merck: Spectroquant Nr. 1.14770).

ManganII reagiert im alkalischen Milieu mit Formaldioxim zu einem rotbraunen Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 445nm liegt. Die Messungen erfolgten mit einem UV-Spektrometer (Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 2) gegen Reagenzienblindproben. Die Proben wurden, wenn nötig, verdünnt, um Absorptionswerte im linearen Bereich der Kalibrierung zu erhalten.

2.5.1.1 Ablösen von Präzipitaten von festen Oberflächen, insbesondere von Membranfiltern

Zum Ablösen von ManganIV-Krusten von Membranfiltern wurden diese zunächst für zehn Minuten in einer Abdampfschale in ca.10mL HCl (rauchend) gelegt.

Anschließend wurde der Filter mit weiteren 10mL HCl (rauchend) gespült. Die Säure wurde dann abgedampft und der Rückstand in 10,0mL Wasser (deion.) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 5,0 mL für die photometrische Messung verwandt.

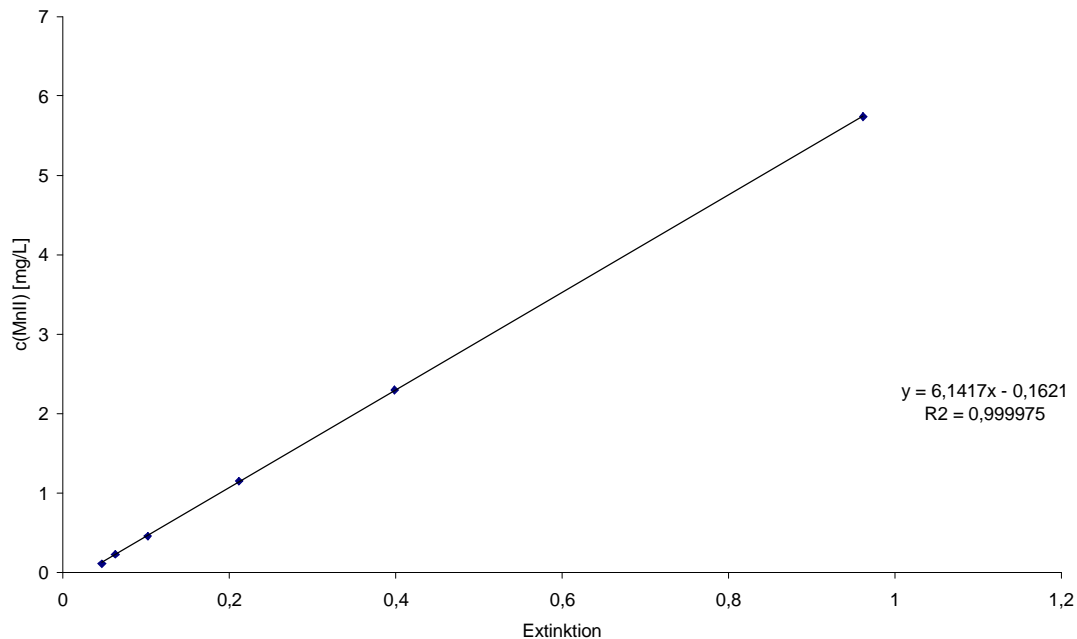


Abb. M1 Kalibriergrade für die photometrische Bestimmung von MnII

2.5.2 Photometrische Bestimmungen von Ammonium, Nitrat und Nitrit

Die Photometrischen Bestimmungen der anorganischen stickstoffhaltigen Ionen Ammonium, Nitrat und Nitrit erfolgten mit Testsätzen der Fa. Bruno Lange, Berlin/Düsseldorf, den enthaltenen Einweg-Rundküvetten, bzw. mit Einweg-Kunststoffküvetten (5cm) der Fa. Bruno Lange.

Folgende Testsätze wurden genutzt:

Ammonium:	LCK 305	(Messbereich 1,3-15 mg/L)
Nitrat:	LCK 339	(Messbereich 1-60 mg/L)
Nitrit:	LCK 341	(Messbereich 0,05-2,0 mg/L)

Die Messungen wurden an einem Digital-Photometer Typ ISIS 9000 (Fa. Bruno Lange) durchgeführt.

2.5.3 pH-Messungen

Die pH-Messungen erfolgten mit einer Einstabmesskette (Fa. Mettler-Toledo InLab®) an einem METROHM-Meßgerät (E 588). Zur Kalibrierung wurden Standard-Pufferlösungen genutzt (pH4 und pH7,0).

2.5.4 Redoxpotentialmessungen:

Die Messungen des Redoxpotentials in wässrigen Lösungen, bzw. in Medien erfolgten mit einer Ag/AgCl-Meßkette (Metrohm 60402100) an einem Metrohm-Messgerät (E588).

2.5.5 Sauerstoffmessungen

a) Sauerstoffelektrode:

Die amperometrischen Bestimmungen der Sauerstoffkonzentrationen im Wasser erfolgten mit einem Sauerstoffmessgerät (Fa. WTW, Modell OXI 191) und einer Clark-Elektrode.

b) Gaschromatographische Messungen:

Gaschromatograph: Fa. Carlo Erba WLD - GC 6000 Vega Series 2;

Detektortemperatur: 100°C

Säulentemperatur: 50°C

Trägergas: Wasserstoff

2.6 Organismenstammhaltung/ Konservierung

Zur Stammhaltung der isolierten Organismen wurden diese in Glycerin konserviert [BAST 1999].

Hierzu wurde zunächst eine Suspension aus nur wenige Tage alten Kulturen gewonnen. Hiervon wurden je 1 mL in Schraubkappenröhrchen gegeben, in denen sich ca. 4 mL steriles, auf -20°C heruntergekühltes, 60%iges Glycerin befand. Die Röhrchen wurden umgehend gut durchmischt und bei -18 bis -20°C eingelagert.

2.7 Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen

2.7.1 Methodik 1 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen - mit Voranreicherung

Zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen aus eisen- und manganhaltigem Rohwasser wurden für eine Anreicherung zunächst 5L des Rohwassers in einen offenen Glasbehälter gegeben und Hefeextrakt, sowie ManganII hinzugefügt (vgl. Tab.1). Der Anreicherungsansatz wurde bei 17°C inkubiert. Es bildete sich nach wenigen Tagen eine dünne, metallisch glänzende Kahmhaut, nach weiteren sieben Tagen bildeten sich nahe der Oberfläche braun-schwarze Flocken. Von beiden Stellen wurde mit einer Impföse etwas Material abgenommen und in eine sterile Petrischale gegeben. Hier wurde das Material mehrfach mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend in fallender Reihe auf folgenden Medien ausplattiert: Medium Mn2 - Mn4 - LX1 - LX2 und SidA.

Die Medien wurden bei 25°C bis zum Auftreten braun-schwarz-verkrusteter Kolonien inkubiert. Zu Überprüfung auf Manganoxidation wurde der Benzidin-Test (vgl. Nr.2.3.1) angewandt.

2.7.2 Methodik 2 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen - ohne Voranreicherung

Zur Isolierung wurde hier direkt etwas rot-braunes Material aus dem jeweiligen natürlichen Habitat entnommen. Einzelne Flocken wurden direkt auf die

entsprechenden Medien (Mn²⁺; Mn⁴⁺; LX1, LX2 und SidA) gegeben, ebenfalls in fallender Reihe ausplattiert und bei 25°C bis zum Auftreten braun-schwarzer Kolonien inkubiert. Nach dem Auftreten entsprechender Kolonien werden diese nach positivem Benzidin-Test weiter durch Abimpfen – unter Umständen mit Hilfe einer Stereolupe - und weiterem Ausplattieren bis zum Erhalt einer Reinkultur vereinzelt.

2.7.3 Methodik 3 zur Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen ohne Voranreicherung – Membranfilterverfahren

Zur Isolierung nach dem Membranfilterverfahren ohne Voranreicherung wird ein, je nach Trübungsgrad der Probe ausgewähltes, Volumen (100-1000mL) membranfiltriert (Porengröße 0,2µm), der Membranfilter direkt auf ein Isolierungsmedium gelegt und aerob bei 25°C inkubiert. Bei stark ausgeprägten Filterrückständen kann auch vom Filterkuchen etwas Material mit der Impfnadel abgenommen und in fallender Reihe ausplattiert werden. Die weiteren Aufreinigungsschritte erfolgen wie unter 2.7.1 und 2.7.2 beschrieben.

2.8. Methodik des Schicht-Beimpfens von Kleinsäulen-Testanlagen

Die entsprechenden Mikroorganismen werden zunächst in Flüssigkulturen vorgezogen. Die Organismen der Leptothrix-Gruppe werden im Medium LX1 (FeII und MnII-frei) für fünf Tage bei 25°C aerob, dunkel bei horizontalem Schütteln (ca. 110rpm) inkubiert. Es wird pro Kleinsäule (vgl. Abb. 3) etwa das Material aus 1000mL Medium benötigt. Die Kapselbildner werden analog vorgezogen, allerdings im Flüssigmedium⁷. Überschüssiges Flüssigmedium wird durch Dekantieren entfernt und der Bodensatz mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Die gut gereinigten Glassäulen (insbesondere FeIII und MnIV-Verkrustungen müssen beseitigt werden) werden zunächst mit einer Stützschrift aus ca. 7cm handelsüblichen Blähton befüllt. Anschließend werden ca. 10 cm des eigentlichen Kiesmaterials eingefüllt (in der Regel wurde Quarzkies der Korngröße 1,5-4mm genutzt). Auf diese Schicht wird das Zellmaterial aus ca. 200mL Medium gegeben, bevor eine weitere Schicht Kies aufgefüllt wird. In diesem Wechsel wird die Säule

befüllt. Als Abschluss werden noch einmal 3-5 cm Kies auf die oberste Schicht Biomasse gegeben. Über dieser Schicht sollten ca. 5-10 cm Wasser überstehen (vgl. Abb. 3).

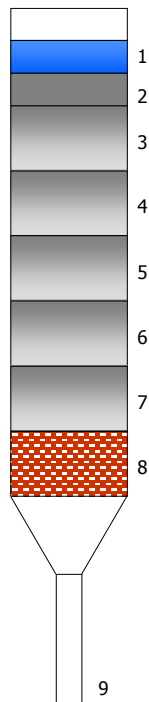


Abb. M5 Testsäule zum Einsatz von Starterkulturen für die natürlich-biologische Entmanganung

1 – Überstand

2 - Aufliegende Kiesschicht (ca. 3-5cm)

3-7 - beimpfte Kiessschichten (je ca. 10cm)

8 – Stützschiicht aus Blähton

9 – Auslauf

3. Ergebnisse

3.1 Isolierungen manganoxidierender Mikroorganismen

Es wurden aus folgenden Standorten Wasser- und Schlammproben entnommen und für die Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen verwandt:

- a) Zulauf – „Dowesee“ Teich im Braunschweiger Stadtgebiet;
- b) TU Braunschweig, Grundwasseraufbereitungsanlage Technikum;
- c) Rohwasser eines niedersächsischen Mineralbrunnenbetriebes;
- d) Wasserwerk Wolfsburg-Rühen – Rückspülschlamm;
- e) „Tommy“- Quelle Stadtwald Wolfsburg;
- f) Teichsediment eines Teiches in Großhansdorf (bei Hamburg);

Es konnten aus diesen Standorten noch näher zu charakterisierende 19 Isolate gewonnen werden. Zusätzlich wurde ein bereits im Institut vorhandenes Isolat genutzt.

	Kürzel	Ort der Probennahme	Typus	Methodik der Isolierung
1.	L1	Dowesee- Zulauf	Scheidenbildner	1
2.	R1	Dowesee- Zulauf	Scheidenbildner	3
3.	R4	Dowesee- Zulauf	Scheidenbildner	3
4.	D1	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
5.	D2	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
6.	D3	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
7.	D4	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
8.	D5	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
9.	D6	Dowesee- Zulauf	Kapselbildend	3
10.	DHE	Dowesee- Zulauf	Schleimbildende Hefe	3
11.	Th	Tommy-Quelle	Scheidenbildner	1
12.	KIN	Institutseigen	Kapselbildend	-
13.	Au1	Rohwasser Mineralbrunnen	Kapselbildend	3
14.	Au2	Rohwasser - Mineralbrunnen	Kapselbildend	3
15.	K1	Rohwasser - Mineralbrunnen	Kapselbildend	3
16.	K2	Rohwasser - Mineralbrunnen	Kapselbildend	3
17.	HE	Rohwasser - Mineralbrunnen	Schleimbildende Hefe	3
18.	GHD	Teichsediment Großhansdorf	Kapselbildend	2
19.	A	Grundwasseraufbereitung Technikum TU	Aerober Sporenbildner	2
20.	W1	Rückspülschlamm Wasserwerk Wob-Rühen	Kapselbildend	2

Tab. 1 Übersicht der untersuchten Isolate mit ihren Kürzeln, dem Ort der Probenahme und der Isolationsmethodik (vgl. Nr. 2.7.1 – 2.7.3)

Im Laufe der Isolierungsarbeiten zeigte sich, dass sich die Mikroorganismen bezüglich der Manganoxidation, des Wachstums und der Koloniemorphologie auf den genutzten Medien LX1, LX2, SidA, Mn2 und Mn4 zum Teil erheblich unterscheiden.

So lässt sich die Manganoxidation bei einigen Isolaten nur auf einem oder nur wenigen der angebotenen Medien beobachten (so zeigt Isolat R1 nur auf Medium Mn2 Manganoxidation).

Die Medien unterscheiden sich vor allem hinsichtlich Art und Konzentration der organischen Substanzen, des pH-Wertes, der Mangankonzentration, und der Pufferkapazität.

3.2. Einordnung der isolierten Mikroorganismen aufgrund morphologischer oder physiologischer Eigenschaften

3.2.1 Isolat L1 - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [μm]	5x1 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Stäbchenförmig, zum Teil in Ketten (bis zu 60 μm lang), Scheidenbildung zu Beginn der Kultivierungsphase
Begeißelung	Monopolar, monotrich
Gramfärbung	Negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Je nach Medium von cremefarben über gelblich bis orange
Einschlüsse	+
Katalase	+
Lactatverwertung	-
Acetatverwertung	-

Tab. 2

Das Isolat L1 zeigte in den ersten Monaten nach der Isolierung die für *Leptothrix spec.* **typische Scheidenbildung**. Diese **Fähigkeit ging bei weiterer Kultivierung jedoch verloren**, so dass das Isolat aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften zwar als *Leptothrix discophora* identifiziert werden konnte (gemäß Spring [SPRING 2002]), in der Folge jedoch als „nicht-scheidenbildende *Leptothrix discophora* –Variante“ angesprochen wird. Wird die

klassischer Literatur manganoxidierender Mikroorganismen hinzugezogen [z.B. CHOLODNY 1926], so ist aufgrund morphologischer Merkmale auch eine taxonomische Einordnung als *Leptothrix sideropous* denkbar.

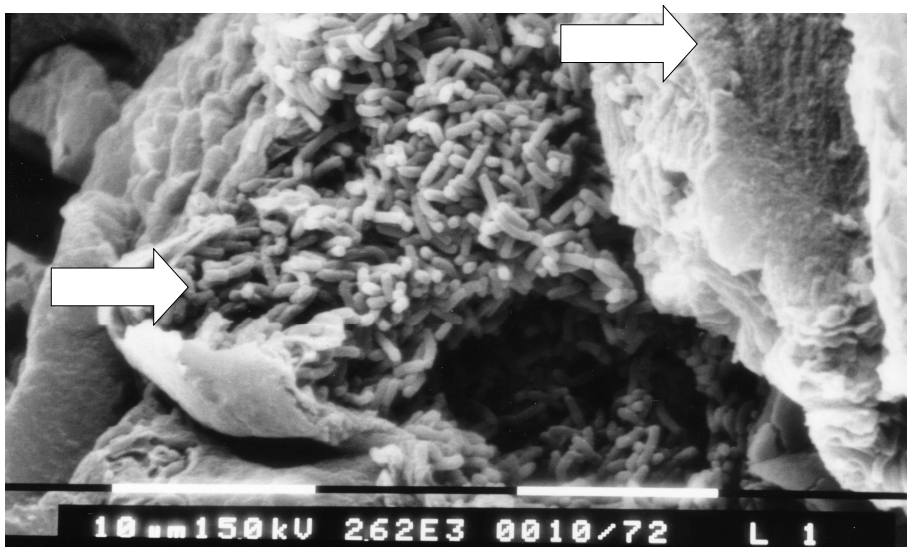


Abb. 4 Isolat L1 - Zellkolonie nach 6d Inkubation auf Medium LX1. Die Kolonie wird umschlossen durch eine Schicht extrazellulärer polymerer Substanz (EPS). Scheiden- oder Haftscheibenbildung ist nicht zu erkennen

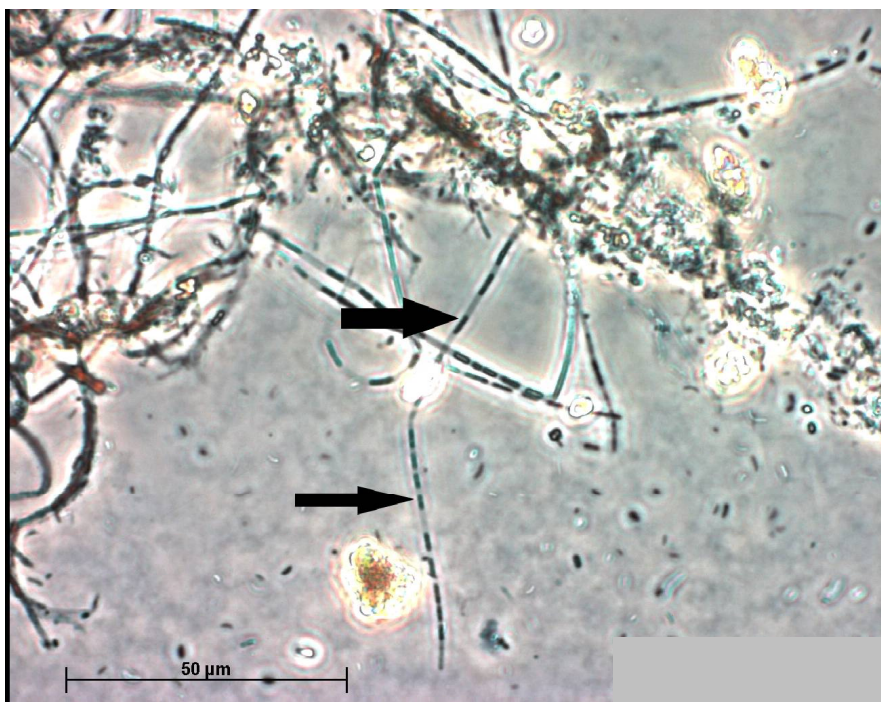


Abb. 5 Isolat L1 in der Anreicherungsphase. Deutlich erkennbar sind die Zellen im unverzerten Scheidenmaterial (Pfeile), sowie verockerte Scheiden

3.2.2 Isolat R1 - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [μm]	4x1 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Stäbchenförmig, zum Teil in Ketten; Ausbildung relativ kurzer Scheiden
Begeißelung	n.b.
Bildung von Haftscheiben	Keine
Scheinbare Verzweigungen	Keine
Gramfärbung	Negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Farblos
Einschlüsse	+
Katalase	+
Ethanol-Verwertung	-
Methanol-Verwertung	-
Stickstofffixierung	-
Gasbildung aus Glucose	-
Säurebildung aus Glucose	-
Nitratreduktion	+
Celluloseverwertung	-
Lactatverwertung	-
Acetatverwertung	-

Tab. 3 Isolat R1 konnte durch die Scheidenbildung in die Gattung „Leptothrix“ eingeordnet werden. Die Bestimmung der Art wurde nicht vorgenommen.

3.2.3 Isolat R4 - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [μm]	1 x 4 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Stäbchenförmig, zum Teil in Ketten Mit einzelnen Verzweigungen; Scheidenbildung
Begeißelung	n.b.
Scheinbare Verzweigungen	Ja
Haftscheibenbildung	Ja
Gramfärbung	Negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Je nach Medium von farblos über gelblich bis orange
Einschlüsse	+
Katalase	+
Lactat-Verwertung	+
Ethanol-Verwertung	-
Methanol-Verwertung	-
Gasbildung aus Glucose	-
Säurebildung aus Glucose	-
Nitratreduktion	+
Acetatverwertung	+

Tab. 4

Das vorliegende Isolat konnte aufgrund dieser Ergebnisse (gemäß Spring [SPRING 2002]) als *Leptothrix lopholea* identifiziert werden. Unter Einbeziehung der klassischen Literatur von Cholodny [CHOLODNY 1926] oder Beger [BEGER 1937] ist auch eine Einordnung als *L. echinata* oder *L. crassa* (späterer Name: *L. discophora*) möglich.

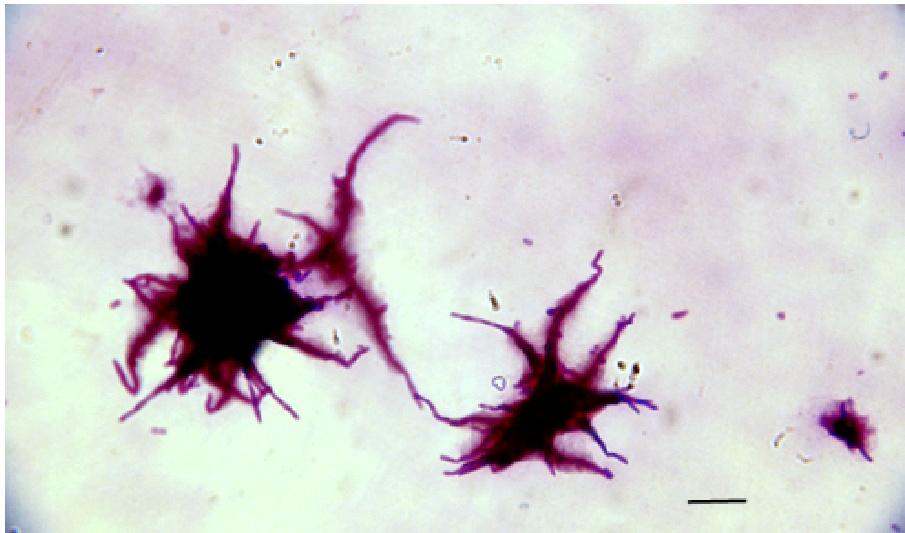


Abb. 6 Isolat R4 - mit Karbolfuchsin gefärbtes Präparat, Balken = 10µm

3.2.4 Isolat D1 - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [µm]	2-3x1µm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Kurze, einzelne Stäbchen, bei Manganoxidation einzeln in Kapseln
Begeißelung	Polar
Gramfärbung	Negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Farblos bis gelblich
Einschlüsse	-
Katalase	-
Lactatverwertung	-
Indol-Verwertung	-
Ethanol-Verwertung	-
Methanol-Verwertung	-
Gasbildung aus Glucose	-
Säurebildung aus Glucose	-
Nitratreduktion	-
Acetatverwertung	-

Tab. 5

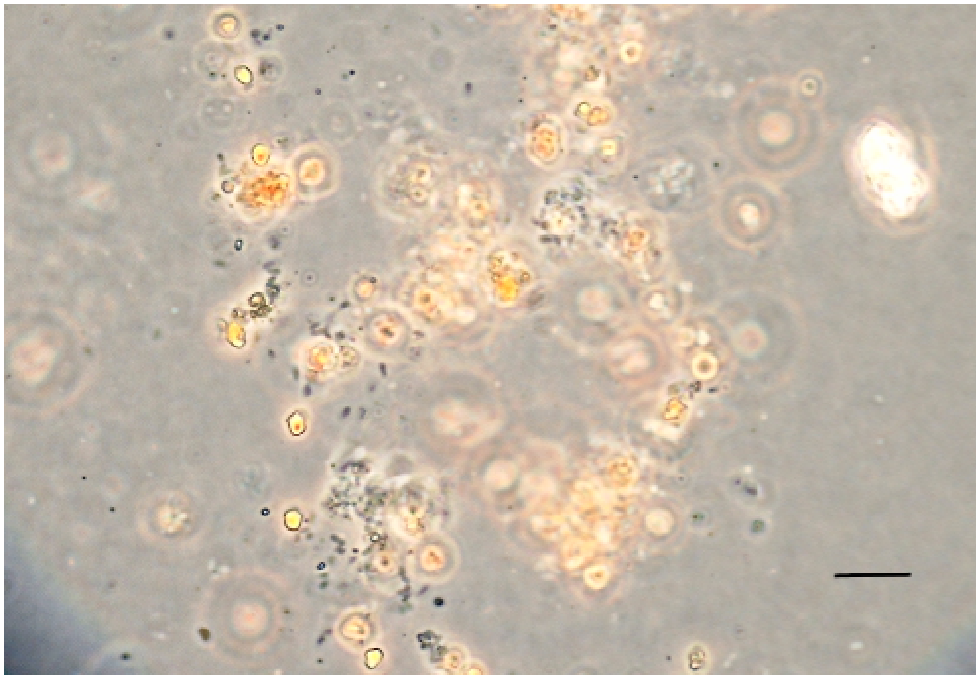


Abb. 7 Isolat D1 - Phasenkontrastaufnahme mit Manganoxidpartikeln
Balken = 10μm

Die Zellen liegen einzeln vor und sind von einer **amorphen Manganoxidschicht** umgeben. Eine deutliche Abgrenzung eines Ringes um die Einzelzellen herum, wie etwa von *Naumanniella* oder *Ochrobium* bekannt, liegt nicht vor. Aufgrund morphologischer Differenzen wird Isolat D1 daher nicht in diese Gattungen eingefügt. Auch liegen nur wenig Gemeinsamkeiten mit den Merkmalen der Gattung *Siderocapsa* vor, so dass auch hier eine Zuordnung nicht vorgenommen werden kann. Eine Bestimmung des Isolats D1 bleibt daher aus.

3.2.5 Isolat Th - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [μm]	1 x 5 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Zellen in Ketten angeordnet, zum Teil durch Scheiden umhüllt.
Begeißelung	Monotrich monopolar
Gramfärbung	Negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Cremefarben bis orange (je nach Medium)
Einschlüsse	+
Katalase	+
Lactatverwertung	n.d.

Tab.6

Aufgrund der vorliegenden morphologischen und physiologischen Daten wird Isolat Th gemäß Spring [SPRING 2002] als *Leptothrix discophora* eingestuft.

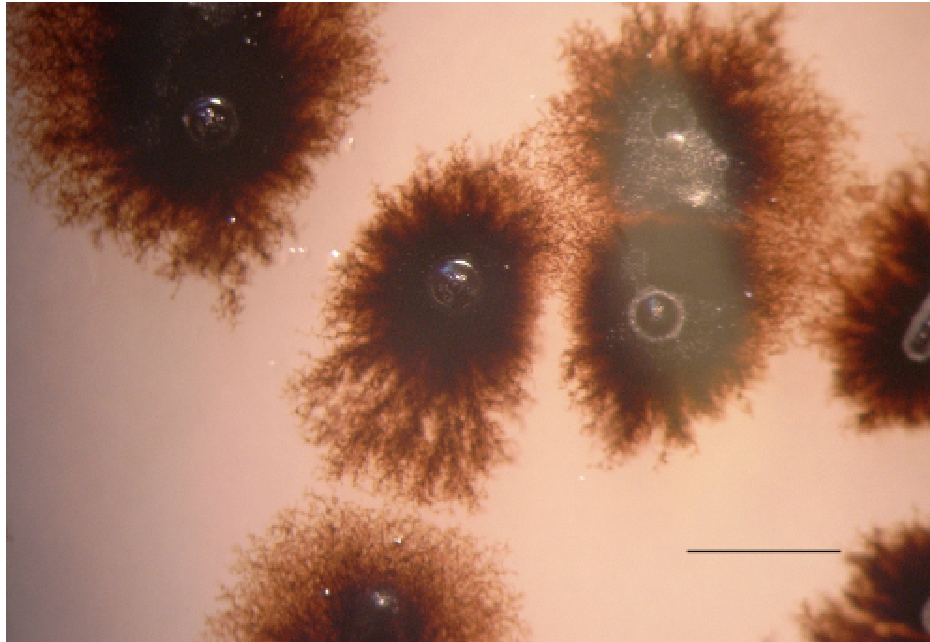


Abb. 8 Aufnahme einer Kolonie des Isolats Th mit der Stereolupe.
Balken = 2mm

3.2.6 Isolat KIN - morphologische und physiologische Eigenschaften

Zellgröße [μm]	1x2 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Einzelne Kurzstäbchen
Begeißelung	Monotrich polar
Gramfärbung	-
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Farblos bis gelblich
Einschlüsse	-
Katalase	+
Indol-Verwertung	-
Säurebildung aus Glucose	+
Nitratreduktion	+

Tab. 7

Isolat KIN wurde von Kinzinger [KINZINGER 1987] als *Pseudomonas manganoxidans* bestimmt. Aufgrund der morphologischen und physiologischen Untersuchungen kann diese Eingruppierung bestätigt werden.

3.2.7 Weitere Isolate - Zellmorphologische, in der gängigen Literatur nicht beschriebene Besonderheiten

Im Verlauf der Isolierungen traten eine Anzahl morphologisch und taxonomisch bislang nicht beschriebener Mikroorganismen auf, die an dieser Stelle kurz vorgestellt werden sollen.

3.2.7.1 Manganoxidierende Hefe mit ausgeprägter EPS-Bildung

Im Rahmen der Isolierungen wurden aus zwei Habitaten manganoxidierende Hefen isoliert:

1. Zulauf – „Dowesee“ Teich im Braunschweiger Stadtgebiet;
1. Rohwasser eines niedersächsischen Mineralbrunnenbetriebes;

Manganoxidierende Hefen sind in der gängigen Literatur bislang nicht aufgeführt. Beide Isolate zeichnen sich durch eine ausgeprägte Bildung extrazellulärer polymerer Substanz (EPS) aus (vgl. Abb. 10 und 11).

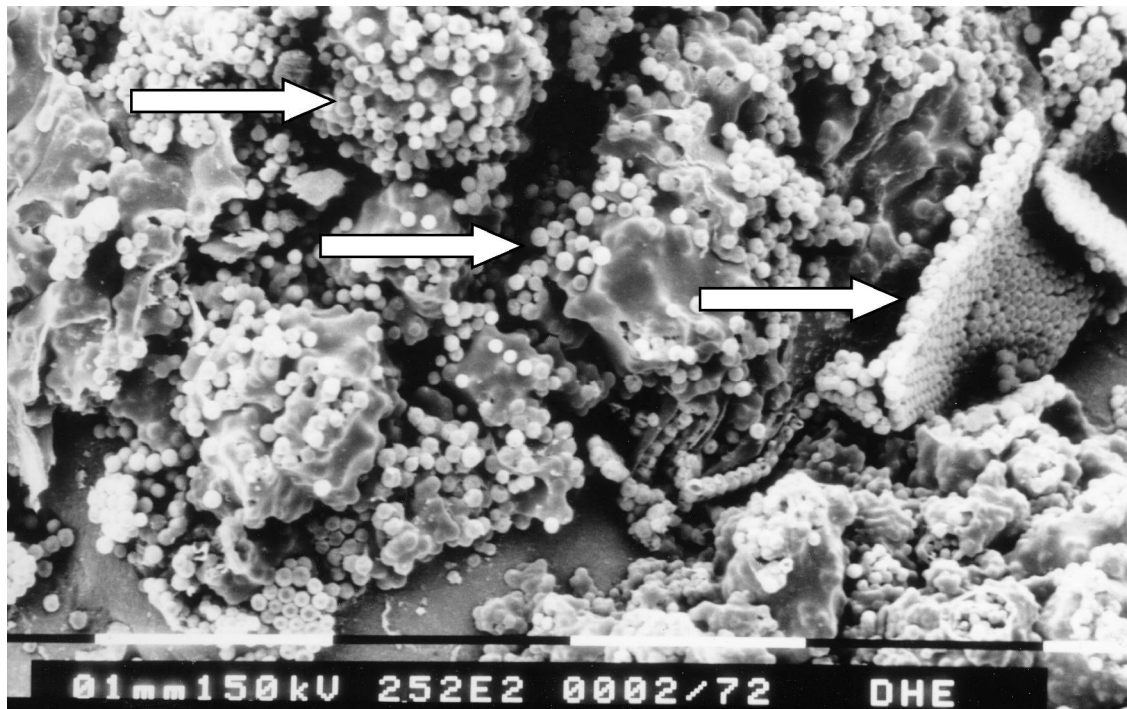


Abb. 9 Isolat DHE nach 12d Inkubation bei 25°C auf Medium SidA. Deutlich sichtbar ist der teilweise Überzug der Hefe-Kolonie mit EPS.

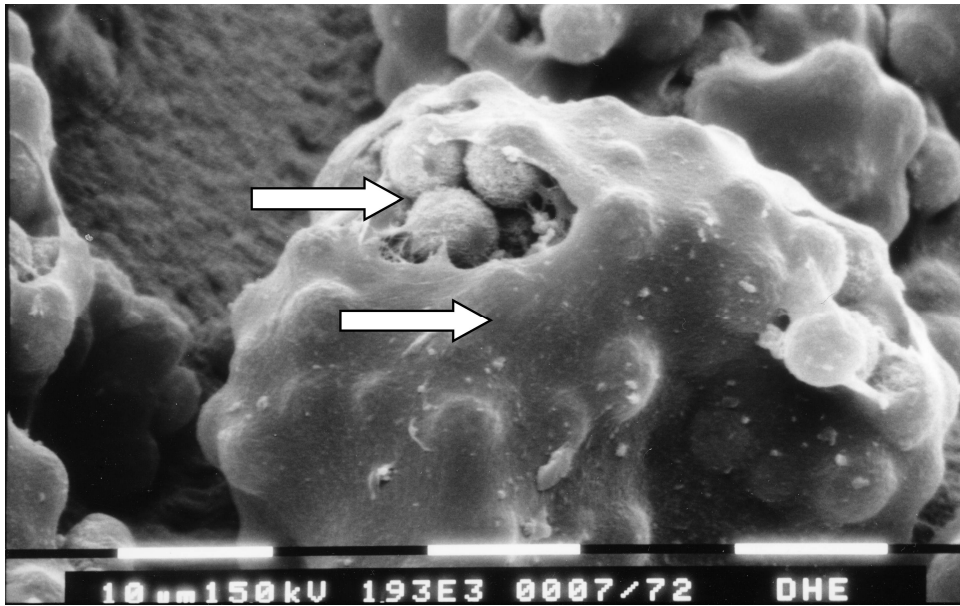


Abb. 10 Isolat DHE nach 12d Inkubation bei 25°C auf Medium Sid A. Fast vollständiger Überzug eines Zellhaufens mit EPS.

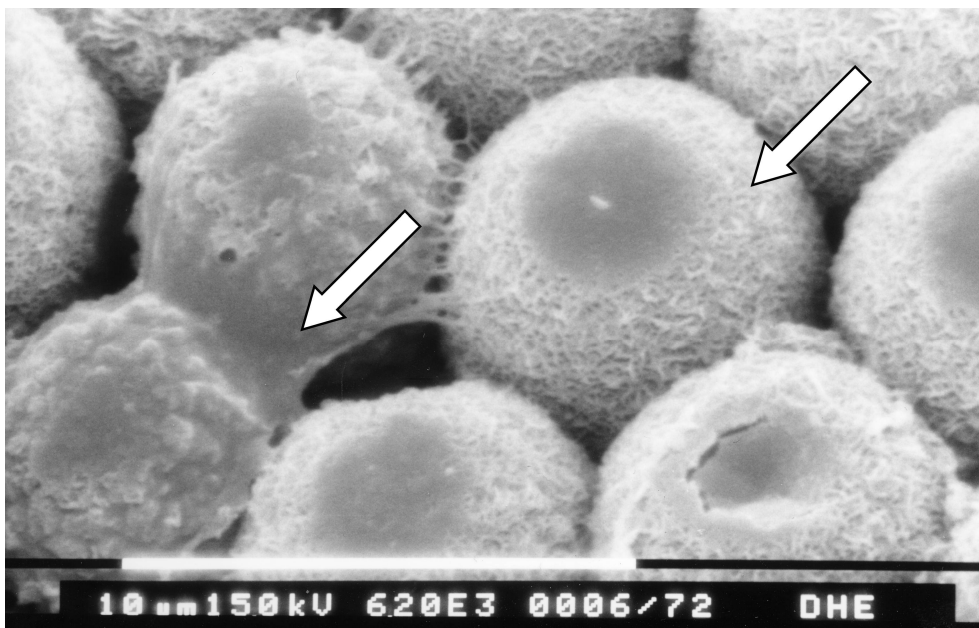


Abb. 11 Isolat DHE nach 12d Inkubation bei 25°C auf Medium Sid A. Einzelzell-Anordnung nur teilweise durch EPS bedeckt.

Nähere physiologische Untersuchungen und eine taxonomische Einordnung wurden nicht vorgenommen.

3.2.7.2 Isolat K1

Bei Isolate K1 handelt es sich, wie bei den Isolaten Au1, Au2 und K2 um manganoxidierende Isolate aus dem unter 3.10.2 näher charakterisierten und untersuchten Mineralbrunnenwasser. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen machen deutlich, dass es sich um stäbchenförmige bis coryneforme Bakterien handelt. Die Manganoxidation findet bei diesen Bakterien an aufgelagerten EPS-Bereichen statt (vgl. Abb. 12 und 13). Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen aber auch eindeutig eine Kapselbildung (nicht dargestellt).

Zellgröße [μm]	4x1 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Einzelne Stäbchen, in älteren Kulturen auch kokkoid
Begeißelung	Nicht eindeutig
Gramfärbung	negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	Farblos über gelblich bei stärkerem Organikgehalt ins Rötliche
Einschlüsse	+
Katalase	negativ
Indol-Verwertung	-
Gasbildung aus Glucose	+
Säurebildung aus Glucose	-
Arabinoseverwertung	+
Methanolverwertung	-
Ethanolverwertung	-
Lactatverwertung	+
Nitratreduktion	+

Tab. 8 Isolat K1 - morphologische und physiologische Eigenschaften

Isolat K1 könnte aufgrund morphologischer Eigenschaften als *Siderobacter* angesprochen werden. Die physiologischen Merkmale schließen aber auch eine enge Beziehung zur Gattung *Pseudomonas* nicht aus.

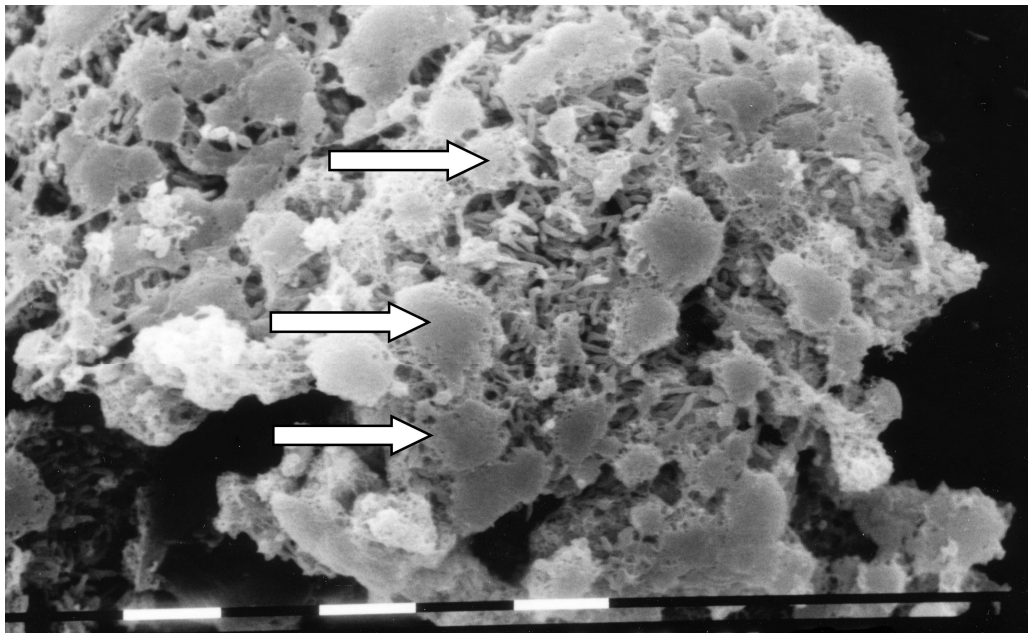


Abb. 12 Isolat K1 - Autochthone manganoxidierende Isolat aus einem Mineral-Rohwasser isoliert. Der Kolonie aufgelagert sind Platten aus extrazellulärer polymerer Substanz (EPS) (Balken = 10μm).

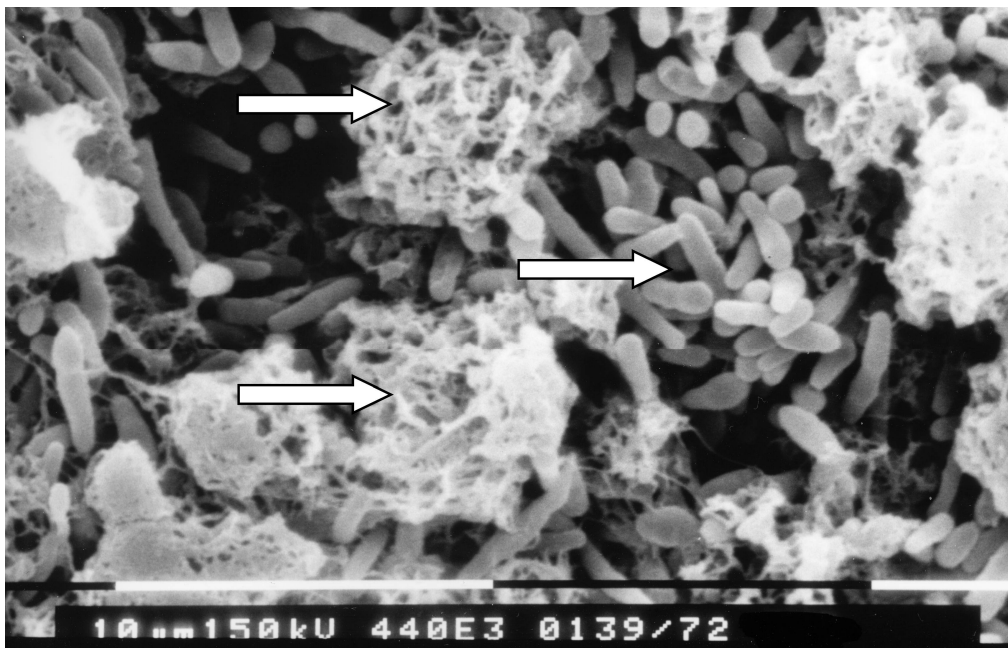


Abb. 13 Isolat K1 als Aufwuchs auf Medium SidA nach 35d Inkubation bei 25°C. Die Zellen liegen einzeln vor. Die Manganoxidation erfolgt in der aufgelagerten EPS.

3.2.7.3 Isolat W1

Isolat W1 wurde aus dem Rückspülschlamm der Trinkwasseraufbereitungsanlage in Wolfsburg-Rühen isoliert. Isolat W1 bildet in Flüssigkulturen kapsuläre Strukturen (eine Zelle pro Kapsel), an denen die Manganoxidation stattfindet.

Zellgröße [μm]	2x1 μm
Aktive Bewegung	+
Zellform und u.U. Zellformation	Einzelne Kurzstäbchen, in älteren Kulturen auch koccoid
Begeißelung	Monopolar monotrich
Gramfärbung	negativ
Sporenbildung	-
Koloniefärbung (ohne Mn-Oxide)	gelblich bis ockerfarben, je nach Medium
Einschlüsse	-
Katalase	positiv
Indol-Verwertung	-
Oxidase	positiv
Säurebildung aus Glucose	-
Arabinoseverwertung	+
Methanolverwertung	-
Ethanolverwertung	+
Lactatverwertung	+
Harnstoffverwertung	+
Citratverwertung	+
Acetatverwertung	+
Lactoseverwertung	-
Nitratreduktion	+

Tab. 9 Isolat W1 - morphologische und physiologische Eigenschaften

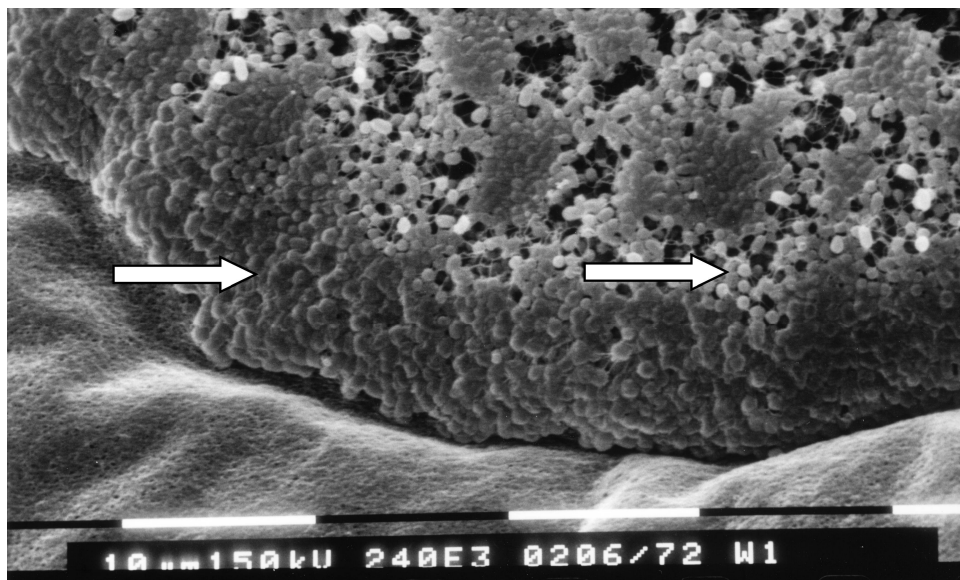


Abb. 14 Isolat W1 - Rand einer Kolonie nach 26d Inkubation bei 25°C auf Medium SidA. Deutlich sichtbar sind vollständig mit EPS überzogene Bereiche, sowie Bereiche mit frei vorliegenden Zellen.

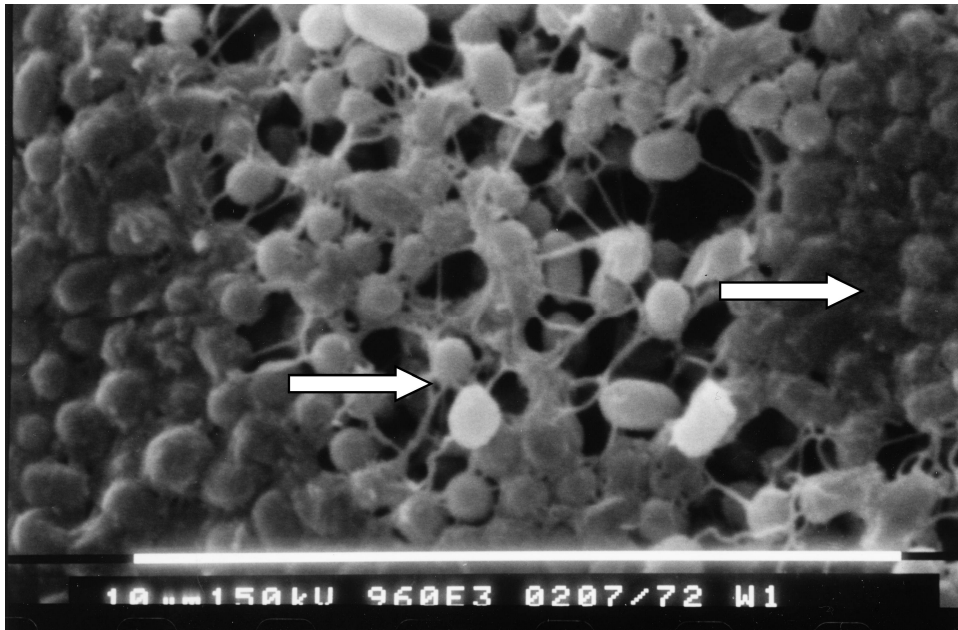


Abb. 15 Isolat W1 - Rand einer Kolonie nach 26d Inkubation bei 25°C auf Medium SidA. Deutlich sichtbar sind vollständig mit EPS überzogene Bereiche, sowie Bereiche mit frei vorliegenden Zellen.

Das Isolat W1 kann aufgrund morphologischer und physiologischer Eigenschaften als Vertreter der Gattung *Siderocapsa* eingruppiert werden. Es besteht allerdings vergleichbar mit Isolat K1 auch eine deutliche Ähnlichkeit zu Arten der Gattung *Pseudomonas*.

Die weiteren vorhandenen Isolate wurden physiologisch nicht näher charakterisiert. Es handelt sich bei ihnen um stäbchenförmige Kapselbildner, sowie eine weitere manganoxidierende Hefe (s. Tabelle 1).

3.3 Vorversuch zum Einsatz nicht-brunneneigener Isolate als Starterkulturen im Testbetrieb zur Entmanganung im Vor-Ort-Grundwasser-Betrieb „Biozentrum“: Nachweis einer natürlichen Metallogenium-Hintergrund-Entmanagnung

Im Rahmen einer Voruntersuchung, wurde in einer Testanlage ein bereits enteisentes, noch manganhaltiges Grundwasser aus dem Biozentrum-Aquifer nach Belüftung durch Festbettreaktoren geleitet, die mit verschiedenen Isolaten beimpft waren. Exemplarisch für die Untersuchungen sind hier die Ergebnisse des Isolats W1 dargestellt (Versuchsaufbau s. Abbildung 169).

Isolat W1 (angezogen auf 10% Caso-Agar für 4d bei 25°C) wird mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen/cm³ Filtervolumen in den Filter eingebracht. Nach einer Ruhezeit von 24h wird das manganII-haltige Wasser mit einer Geschwindigkeit von 1,3m/h durch die Filter geleitet.

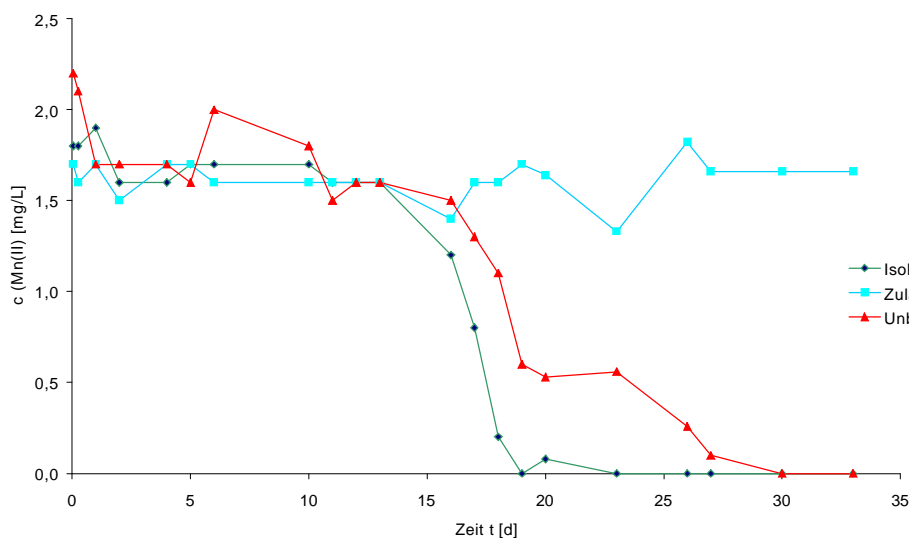


Abb. 16 Vergleich einer beimpften mit einer nicht-beimpften Testanlage zur natürlich-biologisch Entmanganung eines reduzierten Grundwassers am Beispiel des Isolats W1

Der beimpfte Festbettreaktor zeigt nach 19d eine vollständige Eliminierung des MnII im Filterbett. In der unbeimpften Kontrolle vollzieht sich aber ebenfalls eine Entmanganung. Sie entfernt das gelöste ManganII nach 30d quantitativ aus dem Wasser. Dieses Ergebnis ist exemplarisch für die getesteten Isolate. **Bei fast allen zeigen die beimpften Säulen eine Beschleunigung der Entmanganung im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle. Die Beschleunigung ist jedoch nicht befriedigend.** Es stellt sich zudem die Frage, ob die eingetretene Entmanganungsleistung von den eingebrachten Isolaten, oder durch eine wie auch immer verursachte Stimulierung der autochthonen Mikroflora zustande gekommen ist. Aufschluss darüber kann nur eine elektronenmikroskopische Analyse der Biofilme auf dem Kiesmaterial geben (vgl. Abb.17-19).

Dabei zeigt sich, dass sich innerhalb der Biofilme hauptsächlich eine in der Literatur schon beschriebene Art der Manganoxidation ansiedelt. Die Kolonien bestehen

hauptsächlich aus sternförmigen Mikrokolonien mit nach außen spitz zulaufenden Auswüchsen, deren Spitzen zum Teil verdreht sind. Es handelt sich dabei um autochthone Metallogenium-Strukturen. Diese stellen in allen Proben den überwiegenden Anteil der ManganIV-verkrusteten Strukturen. Strukturen, die auf die zugeimpften Mikroorganismen hindeuten, können hingegen nicht wiedergefunden werden. Es muss daher gefolgert werden, dass die Beschleunigung der Einarbeitungszeit nicht mit einer maßgeblichen Entmanganungsleistung der zugeimpften Isolate erklärt werden kann, sondern allenfalls mit einer **Stimulierung der autochthonen Mikroflora** durch das Zuimpfen fremden mikrobiologischen Materials. Der kausale Zusammenhang zwischen dem Zuimpfen ortsfremden Materials und der Stimulierung der autochthonen Mikroflora bleibt jedoch unklar.

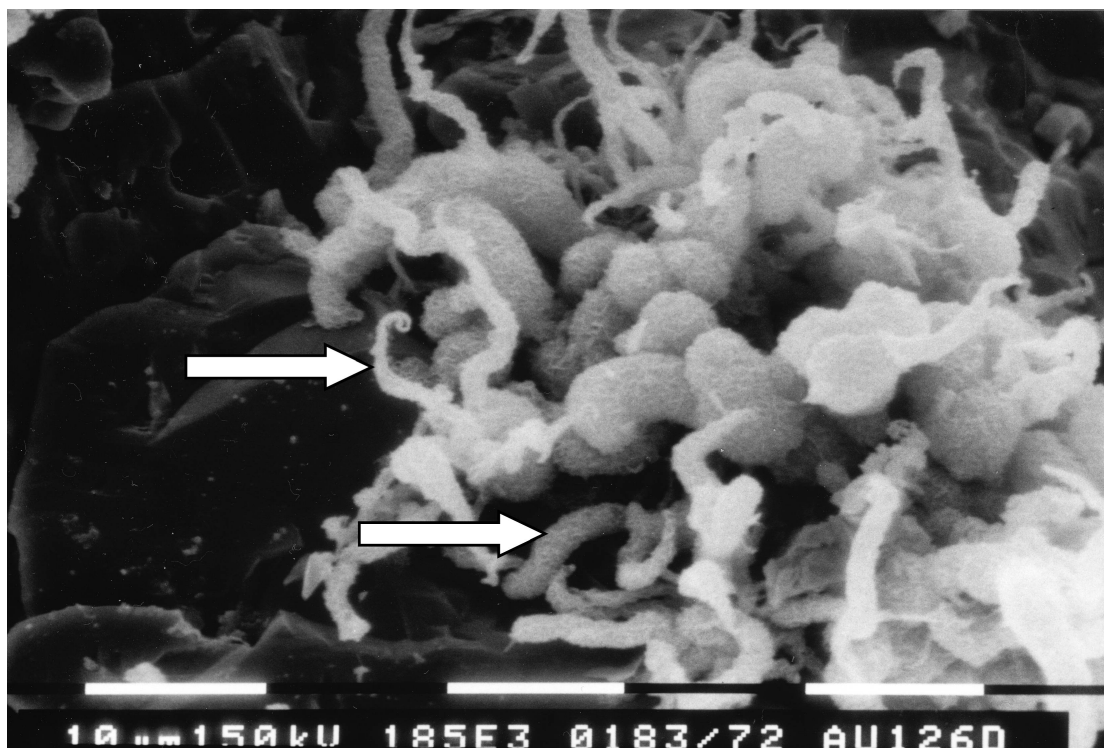


Abb. 17 Mikrokolonie einer eingefahrenen Kleinsäule nach Beimpfen mit Isolat Au1 nach 26d Laufzeit. Es zeigen sich längliche Strukturen, die auf Metallogenium-Strukturen hinweisen.

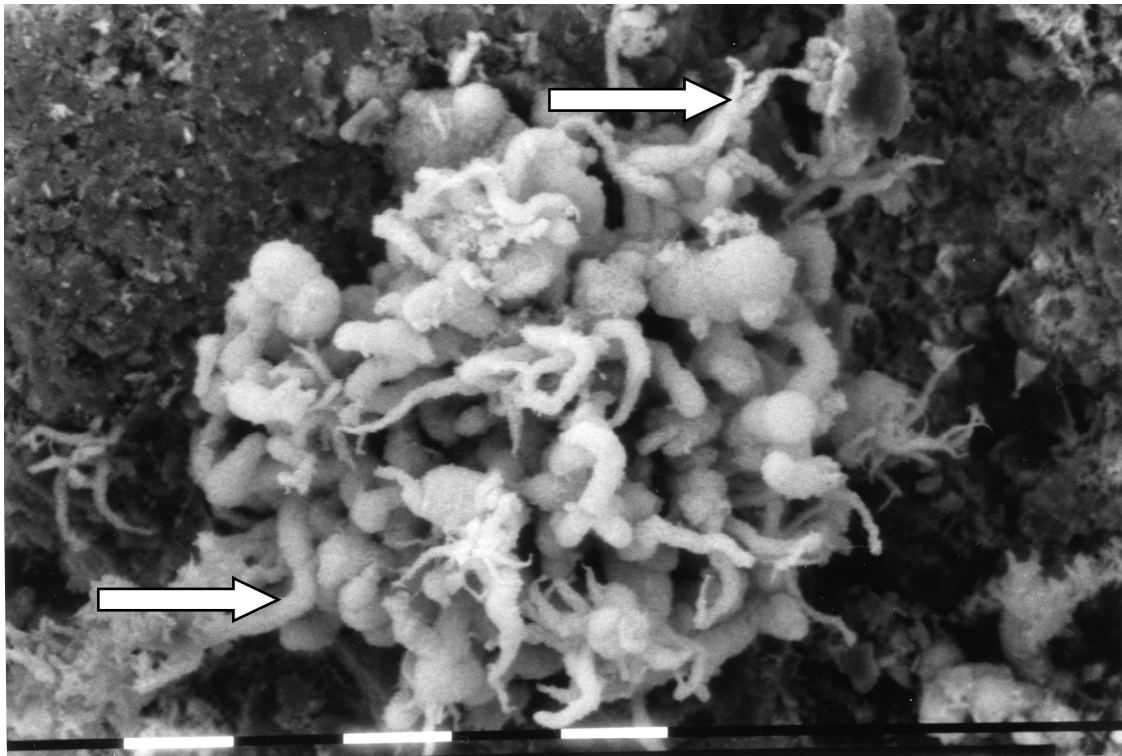


Abb. 18 Mikrokolonie einer eingefahrenen Kleinsäule nach Beimpfen mit Isolat W1 nach 26d Laufzeit. Es zeigen sich längliche Strukturen, die eine sehr große Ähnlichkeit mit Metallogenium-Strukturen aufweisen, die ebenfalls in diesem Grundwasserleiter untersucht worden sind (Balken = 10µm)

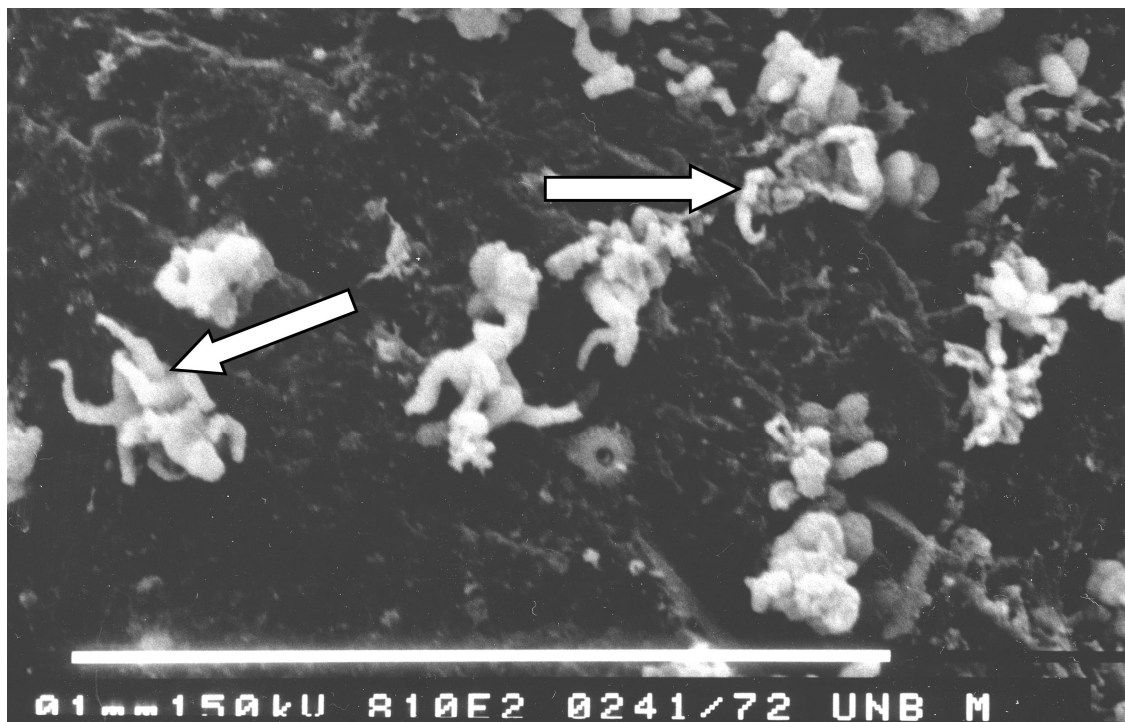


Abb. 19 Mikrokolonie einer eingefahrenen Kleinsäule als unbeimpfte Kontrolle nach 26d Laufzeit. Es zeigen sich die gleichen länglichen Strukturen, die in den Säulen mit den Isolaten W1 und Au1 aufgetreten sind

3.4 Voruntersuchungen zur Physiologie der vorliegenden Isolate: Ausbleibende Manganoxidation im Flüssigmedium

Die Versuche im Kleinsäulenmaßstab zeigen deutlich, dass eine gute und schnelle Manganoxidation auf Festmedien nicht automatisch auf ein flüssiges Habitat und damit eine technische Anwendung zu übertragen ist. Die vorliegenden Isolate müssen daher zunächst hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften charakterisiert werden, um für den Einsatz als Starterkultur im Mineralbrunnenbetrieb erfolgversprechende Isolate selektionieren zu können. Auch wenn die hier untersuchten Isolate aufgrund rechtlicher Bedenken (vgl. Nr. 1.3.1) nicht direkt als Starterkulturen eingesetzt werden können, liefern diese Untersuchungen Hinweise, ob einzelne Arten oder Gattungen manganoxidierender Mikroorganismen in bestimmten Habitaten eher einsetzbar sind, so dass die Konzeption der Anreicherung und Isolierung, sowie der Anlagenplanung bereits auf einen bestimmten Oxidationstyp abgestellt werden kann.

Für die Vorversuche wird Mineralsalzmedium [NÄVEKE/TEPPER 1979] mit 200mg/L Glucose und 7,5 mg/L ManganII (als Mangansulfat) versetzt und die verschiedenen Isolate zugeimpft.

Im Versuchszeitraum erfolgt **keine Manganoxidation im Flüssigmedium** (vgl. Abb. 20). Zunächst muss davon ausgegangen werden, dass hierfür der niedrige pH-Wert verantwortlich ist. Dieser sinkt nach kurzer Inkubation auf ca. pH4 ab (nicht dargestellt). Doch auch im mit HEPES (10mmol) gepufferten Medium tritt keine Manganoxidation auf.

Trotz einer raschen quantitativen Umsetzung des angebotenen C-Quelle (Glucose) wird auch nach 50d Inkubation keine Manganoxidation festgestellt.

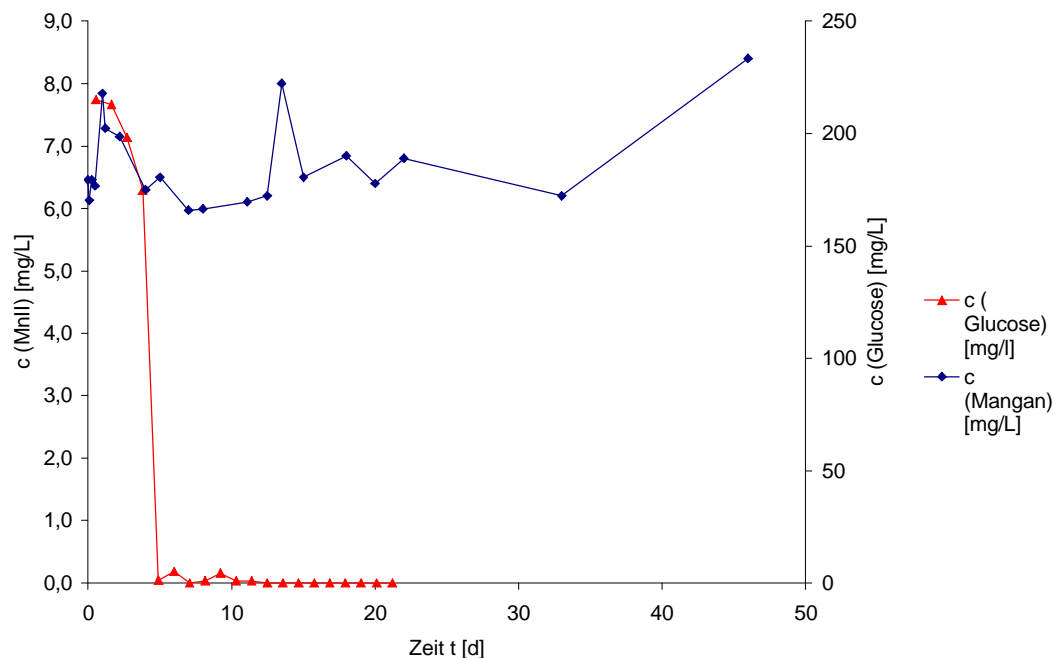


Abb. 20 Zeitlicher Verlauf der Mangankonzentration in einem ungepufferten Batch-Ansatz am Beispiel des Isolats HE. Es findet im Versuchszeitraum keine Manganoxidation statt.

3.5 Nachweis der Fähigkeit der untersuchten Isolate zur Manganoxidation auf Festmedien durch Rückimpfung

Auf Festmedien lassen sich Wachstum und Manganoxidation problemlos wieder induzieren. Dies kann bei den verschiedenen Isolaten durch einfaches Rückimpfen aus der Flüssigkultur auf die standardmäßig verwendeten Festmedien nachgewiesen werden (vgl. Abb. 21 und 22). Bereits nach kurzer Zeit zeigen sich typische braun-schwarz verfärbte Kolonien (benzidin-positiv).

Die untersuchten Mikroorganismen haben ihre Fähigkeit zur Manganoxidation nicht verloren. Die im Flüssigmedium vorliegenden Milieubedingungen hemmen offensichtlich die Manganoxidation.



Abb. 21 Rückimpfversuch Isolat D5
Nach 12d Inkubation auf Medium SidA



Abb. 22 Rückimpfversuch Isolat D1
nach 14d Inkubation auf Medium SidA
(Benzidin-Färbung)

3.6 Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien: Diversität der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit von Organik- und ManganII-konzentration

Da die untersuchten Isolate die Manganoxidation nur auf den genannten Festmedien zeigen, gilt es zu klären, welche Faktoren für das Ausbleiben der Manganoxidation in Flüssigmedien verantwortlich sind. Hierfür kommen zunächst nur wenige Parameter (vgl. Tab. 8) in Betracht, von denen sich die Parameter „Organik“ und „ManganII-Konzentration“ über halbquantitative Untersuchungen auf Festmedien untersuchen lassen.

	Festmedium SidA	Flüssigmedium
Organik	50mg/L Hefeextrakt	200mg/L Glucose
MnII	10 mg/L MnII als MnSO ₄	7,5 mg/L MnII als MnSO ₄
pH-Ausgangswert	7,0	7,0
Agar	12g/L	0 g/L
Pufferung	keine	keine/HEPES*
Mineralsalze	keine	Mineralsalzmedium nach Näveke/Tepper

* beide Varianten wurden ausgetestet.

Tab. 10 Gegenüberstellung der Parameter des standardmäßig verwandten Festmediums und der getesteten Flüssigmedien

3.6.1 Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit vom Organikgehalt im Medium

Für die Untersuchung **der Abhängigkeit der Manganoxidation vom Organikgehalt** im Medium wird das flüssige Basismedium genutzt. Die Parameter pH-Wert und ManganII-Konzentration werden beibehalten und die Organikkonzentration sechsstufig variiert: 0,5mg/L, 5mg/L, 50mg/L, 250 mg/L, 2500mg/L und 25000mg/L. Das optische Ergebnis, ob eine Manganoxidation vorliegt, wird dabei stets mit Benzidin-Testlösung überprüft und nur bei spontaner Blaufärbung als positiv gewertet.

Bei Untersuchung von 17 Isolaten stellen sich drei Typen des Einflusses der Organikkonzentration auf die Manganoxidation heraus:

Typus 1:

Bei Typus 1 zeigt sich eine deutliche Beschleunigung der Manganoxidation mit abnehmender Organikkonzentration. Bei erhöhten Gehalten von Hefeextrakt im Medium bleibt zunächst die Manganoxidation aus (beim beispielhaft dargestellten Isolat R4 ab 250mg/L), bei noch höheren Organikkonzentrationen (hier bei 25000mg/L) kommt es auch zu keiner Koloniebildung mehr (vgl. Abb. 23).

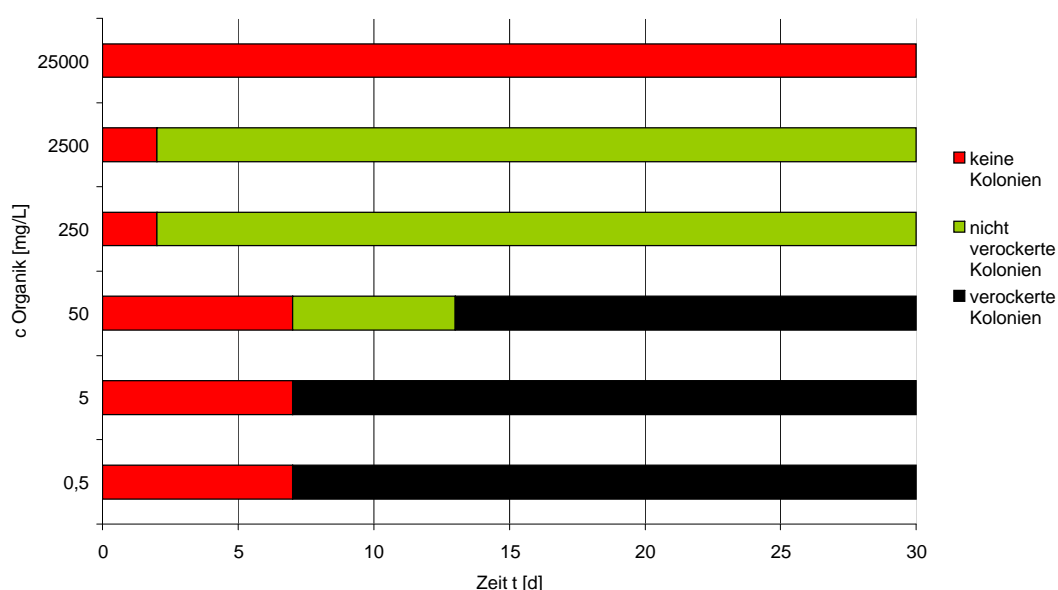


Abb. 23 Isolat R4 - Abhängigkeit der Manganoxidation vom Organikgehalt im Medium. Die Manganoxidation tritt bei niedrigsten Organikgehalten (0,5mg/L, 5mg/L) unmittelbar nach

Auftreten erster Kolonien auf. Bei Konzentrationen über 250mg/L tritt keine Manganoxidation mehr auf (oligocarbophile Manganoxidation)

Typus 2: Für Typus 2 ist das Auftreten einer Manganoxidation nicht eindeutig mit der Organikkonzentration im Medium verbunden. Über weite Konzentrationsbereiche tritt die Manganoxidation nahezu zeitgleich auf. Erst bei Konzentrationen von 25g/L bleiben sowohl Wachstum, als auch Manganoxidation aus (vgl. Abb.24).

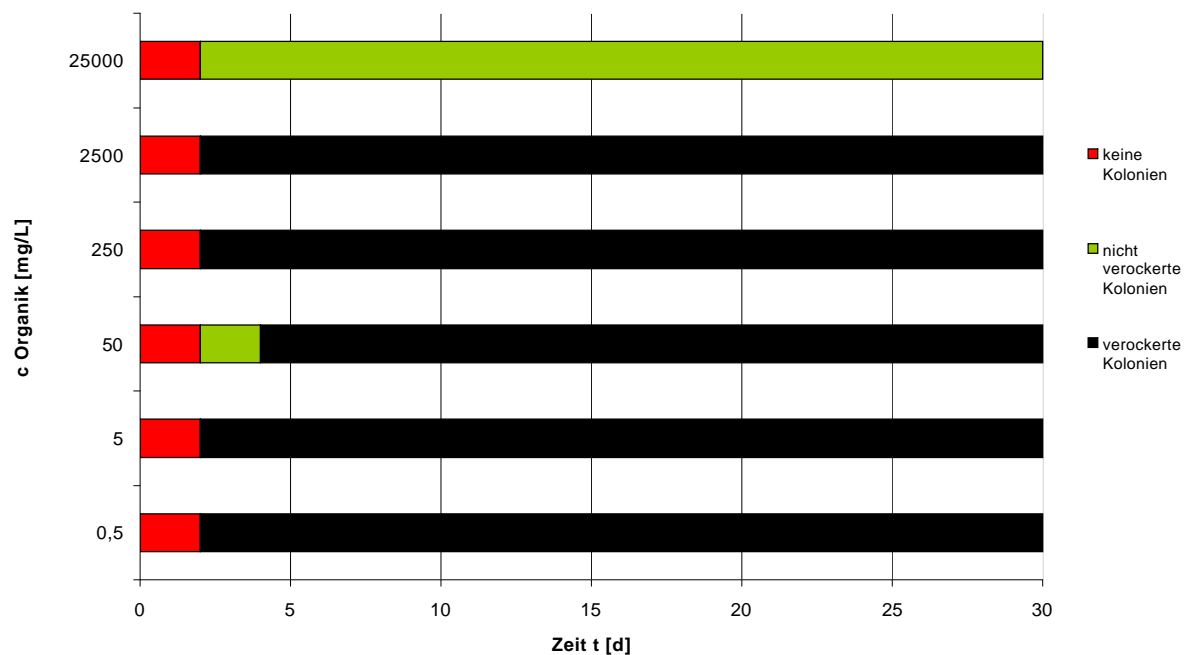


Abb. 24 - Abhängigkeit der Manganoxidation von der Organikkonzentration am Beispiel des Isolats W1 – Im niedrigen Konzentrationsbereichen besteht offenbar kein Einfluss. Erst bei 25g/L Hefeextrakt wird die Manganoxidation eingestellt (Organikresistente Manganoxidation)

Typus 3: Der dritte Typus der Abhängigkeit der Manganoxidation von der Organikkonzentration zeigt eine Manganoxidation nur in einem bestimmten, eng begrenzten Konzentrationsbereich. Ober- und unterhalb dieses Oxidationsfensters findet zwar Wachstum, aber keine Manganoxidation statt (vgl. Abb. 25).

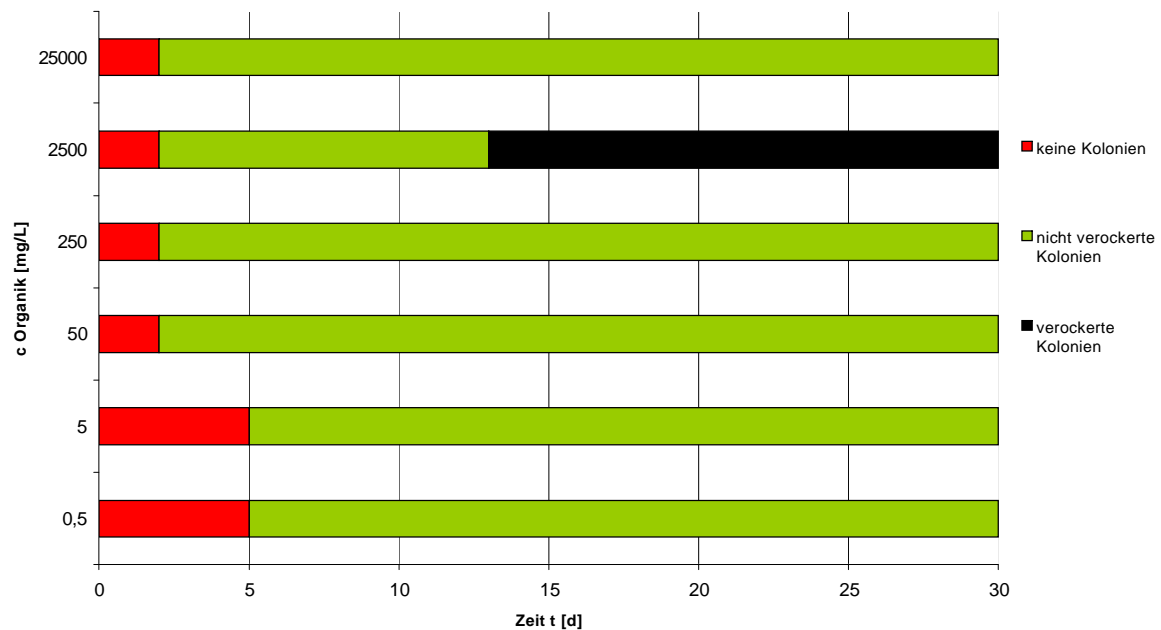


Abb. 25 Einfluss der Organikkonzentration auf die Manganoxidation am Beispiel des Isolats K2. Die Manganoxidation findet im Versuchszeitraum lediglich in einem Bereich um 250mg/L Organik statt. Das Wachstum ist hingegen durch niedrigere oder höhere Organikkonzentrationen qualitativ nicht beeinflusst (organiklimitierte Manganoxidation)

3.6.2 Typisierung der Manganoxidation auf Festmedien in Abhängigkeit von der Mangankonzentration im Medium

Neben der Organikkonzentration ist die **ManganII-Konzentration auf Festmedien als Einflussfaktor auf die Manganoxidation** halbquantitativ zu überprüfen. Im Rahmen von Anreicherung, Isolierung und Kultivierung zeigen die Isolate eine jeweils spezifische Affinität zu den genutzten Medien. Wachstum und Manganoxidation zeigen viele nur auf bestimmten einzelnen Medien. Genutzt wird für diese Versuchsreihe erneut Medium Sid A, mit den angegebenen Werten für pH-Wert, Organikkonzentration, und Agarkonzentration (vgl. 2.1). Als ManganII-Konzentrationsstufen werden mit ManganII-Sulfat eingestellt:

1mg/L, 10mg/L, 30mg/L, 100mg/L, 300mg/L und 1000mg/L.

Auch in dieser Versuchsreihe zeigen sich drei Typen, die mit den unter 3.6.1 genannten durchaus vergleichbar sind.

Typus 1: Typus 1 ist am Beispiel des Isolats Au1 dargestellt. Alle Stämme dieses Typus zeigen eine sehr schnelle Manganoxidation bei geringer ManganII-Konzentration im Medium. Steigende ManganII-Konzentrationen haben eine verzögernde (bei 10mg/L und 30mg/L) bzw. eine hemmende Wirkung auf die Manganoxidation (vgl. Abb. 26)

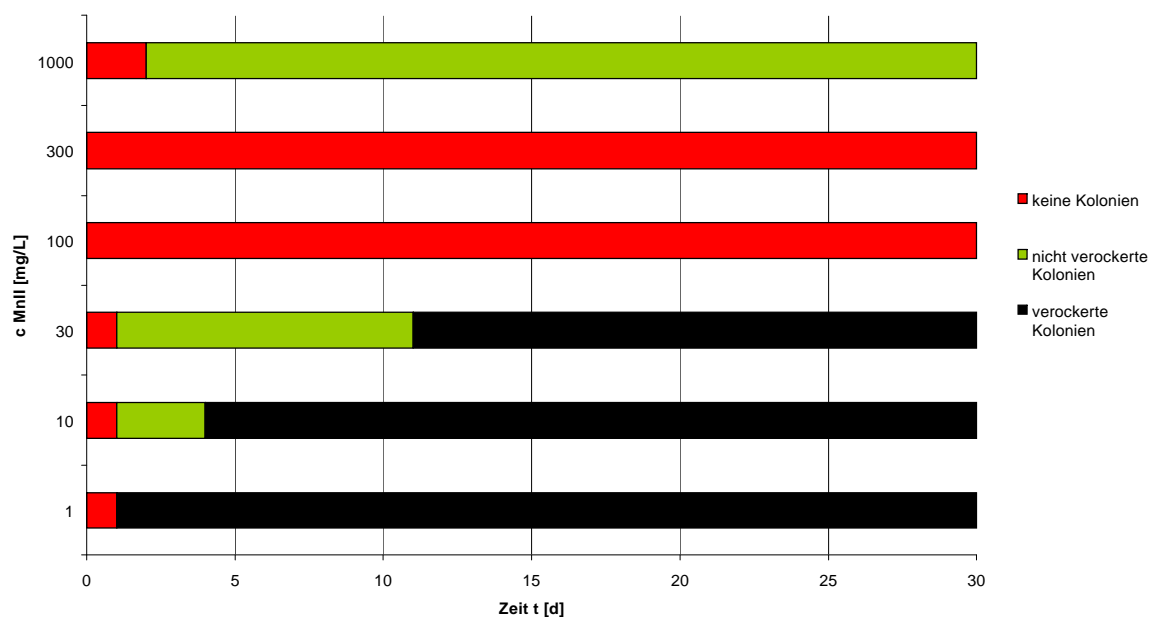


Abb. 26 Isolat Au1 - Verzögerung der Manganoxidation durch zunehmende Mangankonzentration (oligomanganophile Manganoxidation)

Typus 2: Der Typus 2 ist hier am Beispiel des Isolats W1 dargestellt. Der Einfluss der Mangankonzentration auf das Auftreten der Manganoxidation ist gering. Erst bei einer Konzentration von 1000mg/L tritt eine Hemmung der Manganoxidation, nicht aber des Koloniewachstums ein (vgl. Abb. 27).

Typus 3: Die Manganoxidation erfolgt nur in einem kleinen, bestimmten Konzentrationsbereich.

Auch bei der Manganoxidation sind einige Isolate (hier gezeigt am Beispiel des Isolats D3) nur in relativ engen Konzentrationsbereichen in der Lage, ManganII zu oxidieren. Außerhalb dieses „Oxidationsfensters“ findet keine Manganoxidation statt (vgl. Abb. 28).

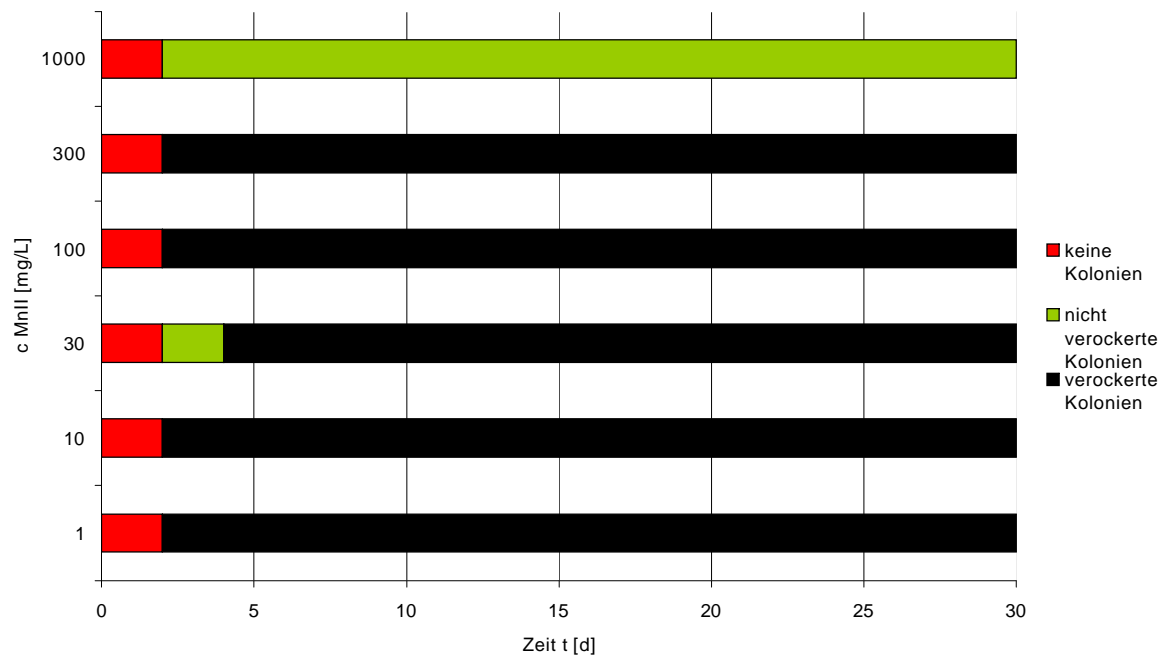


Abb. 27 Einfluss der Mangankonzentration auf die Manganoxidation am Beispiel des Isolats W1. Die Manganoxidation wird erst im Medium mit 1000mg/L MnII gehemmt. Bei niedrigeren Konzentrationen ist hier kein signifikanter Einfluss sichtbar (manganresistente Manganoxidation)

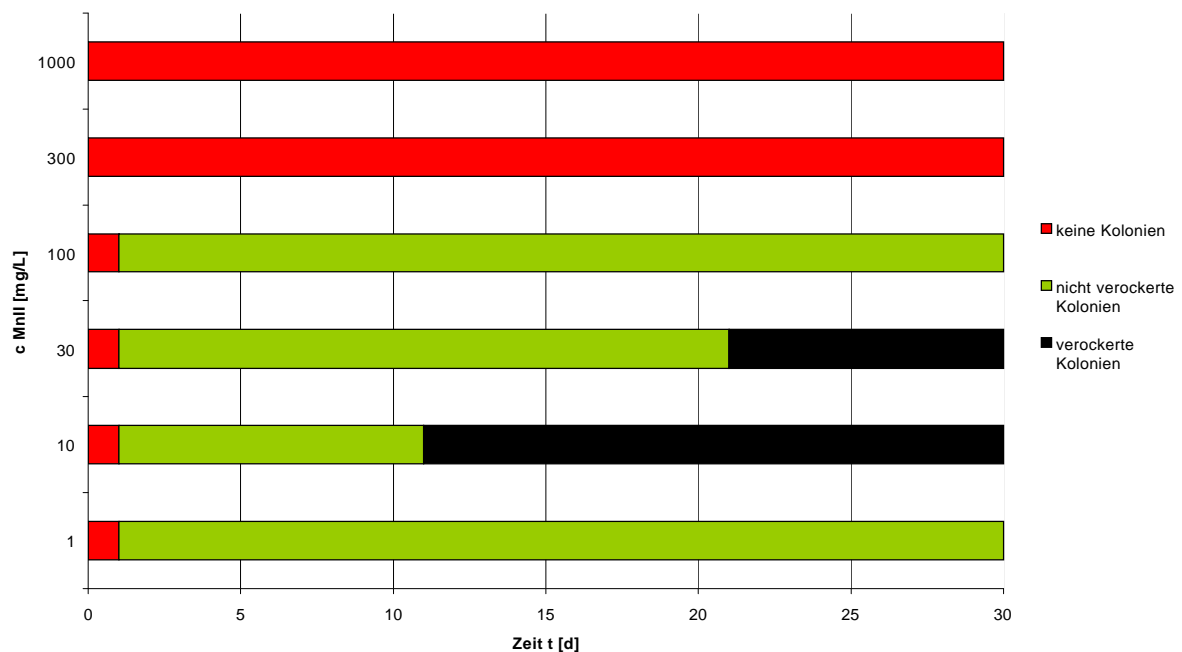


Abb. 28 Isolat D3 – Einfluss der ManganII-Konzentration auf die Manganoxidation. Die Manganoxidation findet nur in einem Bereich zwischen 10 und 30 mg/L MnII statt (manganlimitierte Manganoxidation).

Die halbquantitative Methode zeigt deutlich die Einflüsse, die einzelne Parameter (hier Organik und ManganII) auf die Manganoxidation haben. Diejenigen Isolate, bei denen die Manganoxidation von Veränderungen im Medium kaum tangiert wird, sind möglicherweise besser als Starterkultur in einem für sie fremden Habitat geeignet, als andere, die die Manganoxidation nur in ganz bestimmten „Oxidationsfenstern“ vollziehen.

Die angewandte visuell-kolorimetrische Methodik auf Festmedien offenbart eine prinzipielle physiologische Diversität der Manganoxidation, lässt jedoch keine quantitative Aussagen über die Manganoxidation zu. Da die Manganoxidation bei den allermeisten Isolaten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht im Flüssigmedium induziert werden konnte (vgl. Nr. 3.5), sollte die Methodik auf Festmedien so umgestellt werden, dass quantitative Aussagen zur Manganoxidation möglich werden.

3.7 Versuche zur photometrischen Quantifizierung der Manganoxidation auf Festmedien

Zur Quantifizierung wurden die Versuche nunmehr auf Membranfiltern weitergeführt (Die Membranfilter wurden nach erfolgter Manganoxidation abgelöst (vgl. 2.5.1.1) und das ManganII photometrisch vermessen). Die Messungen gestalteten sich jedoch als schwierig, da offenbar die Manganmengen auf den Filtern meist zu gering waren (vgl. Abb. 29 und 30).

Die Ergebnisse der Festplattenmethode ließen sich dennoch reproduzieren.



Abb. 29 Isolat D5 - Deutliche Abnahme der Manganoxidationsaktivität durch zunehmende Organikkonzentration im Medium (v.l.: 0,5 mg/L, 5mg/L, 50 mg/L, 250 mg/L, 2500 mg/L und 25g/L). Die Braunfärbung auf dem Membranfilter mit 25g/L Hefeextrakt ergibt sich aus dem hohen Organikgehalt des Mediums. Ein durchgeführter Test auf MnIV mit Benzidin-Lösung verlief auf diesem Membranfilter negativ, auf allen anderen Filtern positiv.

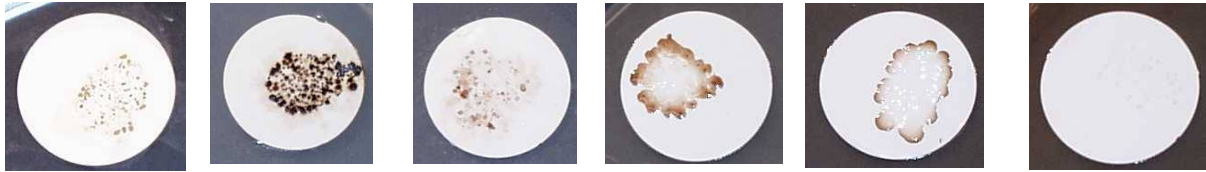


Abb.30 Isolat D5 Verlauf der Manganoxidation unter dem Einfluss steigender Mangankonzentrationen im Medium (v.l.: 1mg/L, 10mg/L, 30 mg/L, 100mg/L, 300 mg/L und 1000 mg/L). Die Manganoxidation wird bei Isolat D5 offenbar erst bei Konzentrationen von deutlich über 300mg/L MnII gehemmt.

3.8 Entwicklung von Zweiphasenmedien (flüssig/fest) zur Überwindung der Manganoxidationshemmung in reinen Flüssigmedien

Neben dem Organikgehalt und der ManganII-Konzentration tritt bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den genutzten Flüssigmedien und den Festmedien der Agargehalt der Festmedien als Unterscheidungskriterium auf. Daher wird das flüssige Basismedium in drei Organikstufen (0,5mg/L, 5mg/L und 50 mg/L) angesetzt und mit



Abb. 31 - Isolat W1 nach 24d Inkubation in den Medien (v.l.) 0,5mg/L, 5mg/L und 50mg/L und einer Zugabe von jeweils 0,1% Agar (oligacarbophile Manganoxidation im Zweiphasenmedium



Abb.32 – Isolat W1 nach 24d Inkubation ohne Agarzugabe

0,1%, sowie ohne Agar als feindisperses Oberflächenvergrößerungsmittel verwendet. Die beimpften Medien zeigen bereits nach wenigen Tagen klare Effekte der Agarzugabe: **Es zeigt sich, dass die Manganoxidation bei Zugabe von Agar (0,1%) ohne Probleme induziert werden kann.** Ohne Agar bleibt die Manganoxidation bis zum Versuchsende nach 60d aus. Grobpartikuläre oberflächenvergrößernde Zugaben wie Kies, Sand oder Glasperlen induzieren die Manganoxidation nicht (nicht dargestellt).

Mit der Entwicklung eines feindispersen Zweiphasenmediums ist eine Methodik zur quantitativen physiologischen Untersuchung der vorliegenden Isolate gefunden.

3.9 Physiologische Untersuchungen an manganoxidierenden Bakterien

Für physiologische Untersuchungen der Mikroorganismen konnte nunmehr auf Flüssigkulturen gewechselt werden. Das Ziel der physiologischen Untersuchungen ist die Klarstellung, welche Isolate oder Isolatgruppen für den Einsatz als Starterkulturen für den technischen Einsatz der natürlich-biologischen Entmanganung geeignet sind. Die gewählten Parameter sollen diejenigen Einflüsse, die ein Mineralwasser mit seinen spezifischen Eigenarten auf die Entmanganungsmikroflora haben kann, repräsentieren. Auch Erfahrungen aus früheren Arbeiten sollen mit einbezogen werden.

Zur Untersuchung werden fünf Isolate ausgewählt, die die Bandbreite der erarbeiteten manganoxidierenden Isolate darstellen:

1. **Isolat Th** – *Leptothrix discophora* scheiden- und haftscheibenbildend;
2. **Isolat L1** – *Leptothrix discophora* – nicht-scheidenbildend, aber haftscheibenbildend;

Die Isolate L1 und Th sind beide als *Leptothrix discophora* identifiziert worden (vgl. 3.2.1 und 3.2.5). Im Rahmen der physiologischen Untersuchungen soll vor allem geklärt werden, welchen Einfluss der Verlust der Fähigkeit zur Scheidenbildung auf die Fähigkeit zur Manganoxidation hat.

3. Isolat R4 – Scheidenbildner *Leptothrix lopholea* mit Haftscheiben (vgl. 3.2.3). Mit diesem Isolat soll eine weitere Art der Gattung *Leptothrix* in die Untersuchungen einbezogen werden, die durch Bildung von Haftscheiben („holdfasts“) zur Festsetzung an Festpartikeln (Immobilisierung) charakterisiert ist.

4. Isolat KIN – Kapselbildner – *Pseudomonas manganoxidans*

Isolat KIN zeichnet sich in Vorversuchen durch eine hohe Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit in der Manganoxidation aus. Es ist unter den bislang getesteten Bedingungen das einzige Isolat außerhalb der Gattung *Leptothrix*, dass in 48h zur deutlichen Manganoxidation auf Festmedien in der Lage ist. Es kann daher als „Schnelloxidierender Kapselbildner“ bezeichnet werden.

5. Isolat D1 - Isolat D1 steht für den Typus der langsamoxidierenden Kapselbildner. Es zeigt eine optisch sichtbare Manganoxidation auf den standardmäßig genutzten Medien (z.B. Basismedium) oft erst nach mehreren Wochen und scheint daher in den Vorversuchen ungeeignet für den Einsatz als Starterkultur in der Mineralwasseraufbereitung. Kurz nach der Isolierung erfolgte die Manganoxidation noch nach wenigen Tagen. Eine mögliche Erklärung ist die Abnahme an für die Manganoxidation essentiellen Substanzen, die dem Organismus zur Ausbildung der manganoxidierenden Faktoren nicht mehr ausreichend zur Verfügung stehen. Hier ist an Spuren- oder Mengenelemente zu denken, deren Fehlen im künstlichen Medium die Manganoxidation verzögern oder hemmen kann.

3.9.1 Der Einfluss des pH-Werts auf die Fähigkeit der untersuchten Stämme zur Manganoxidation

In der Literatur wird oft ein zu niedriger pH-Wert neben einem zu niedrigen Redoxpotential als ursächlich für eine verzögerte oder gehemmte natürlich-biologische Manganoxidation genannt [z.B. MOUCHET 1992]. Dennoch finden sich keine einheitlichen Angaben über die pH-Optima verschiedener Isolate. Das pH-Optimum ist daher für jedes Isolat einzeln zu bestimmen. Mouchet spricht von der Notwendigkeit, in der Trinkwasseraufbereitung den pH-Wert der Wässer auf Werte deutlich über 7 (7,6-8) anzuheben, um die natürlich-biologische Manganoxidation so

zu stimulieren, dass sie in wenigen Tagen einsetzt. Er postuliert, dass zum Einsetzen einer biologischen Entmanganung der pH-Wert vieler Wässer „angepasst“ werden müsse. Hässelbarth und Lüdemann [HÄSSELBARTH/LÜDEMANN 1971] beschreiben hingegen eine biologische Manganoxidation, die bei einem pH-Wert von 7,2 einsetzt, Bromfield [BROMFIELD 1978] beschreibt sogar ein manganoxidierendes Streptomyces-Isolat, das eine Manganoxidation im pH-Bereich zwischen 5 und 6,5 durchführt. Larsen [LARSEN ET AL. 1999] gibt für ein Pedomicrobium-Isolat ein pH_{opt} von 7,0 an. Das untersuchte Isolat zeigt aber auch bei pH 5,5 noch eine deutliche Manganoxidation. Okazaki [OKAZAKI ET AL. 1997], sowie Jung [JUNG ET AL. 1979] geben für Pseudomonas spec. pH-Optima von 7,0 an und Schweisfurth [SCHWEISFURTH 1976] ermittelte in halbquantitativen Versuchen als optimalen Startbereich des pH-Wertes 6,5-7,5. Dennoch wird das Postulat von Mouchet von vielen Autoren geteilt [z.B. GAGE ET AL. 2001] und soll hier bezüglich der fünf gewählten Isolate untersucht werden. Genutzt wird dazu das flüssige gepufferte Basismedium (vgl. 2.8) mit eingestellten pH-Werten zwischen 6,0 und 8,0.

3.9.1.1 Isolat Th – Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation

Die Manganoxidation durch Leptothrix discophora wurde schon des öfteren untersucht. Für die Manganoxidation gibt Boogerd [BOOGERD ET AL. 1987] ein pH_{opt} von 7,5 an, Adams [Adams et al. 1987] gibt für sein Isolat SS1 ein pH_{opt} von 7,3 an.

Für Isolat Th zeigt sich ein pH_{opt} für die Manganoxidation bei 6,5 (vgl. Abb. 33-34). Nach 3d ist im Medium kein gelöstes Mangan mehr nachweisbar. Die Medien mit geringerem oder höherem pH-Wert zeigen eine vollständige Entfernung des ManganII aus dem Medium erst nach 6d (pH 6,0; pH 7,0) bzw. 12d (pH 7,5). **Ein pH-Wert von 8,0 hemmt die Manganoxidation** deutlich. Nach 3d ist praktisch noch keine MnII-Abnahme im Medium zu verzeichnen. Erst nach 6d und 12d ist diese mit 17% bzw. 45% feststellbar.

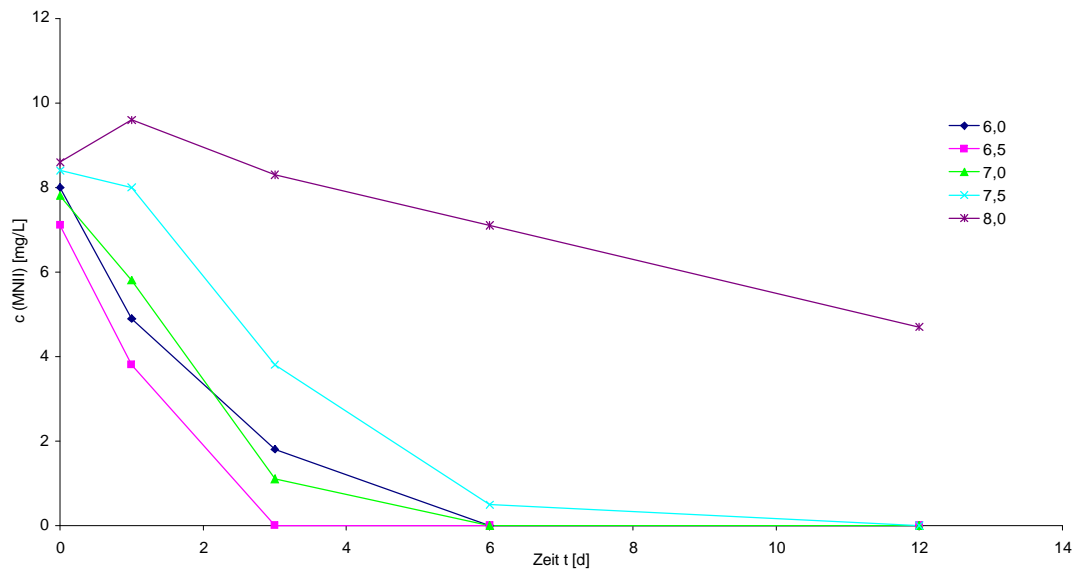


Abb. 33 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Mangankonzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat Th. Nach 3d ist Medium pH 6,5 manganII-frei, nach weiteren 3d die Medien pH 7,0 und Medium 6,0.

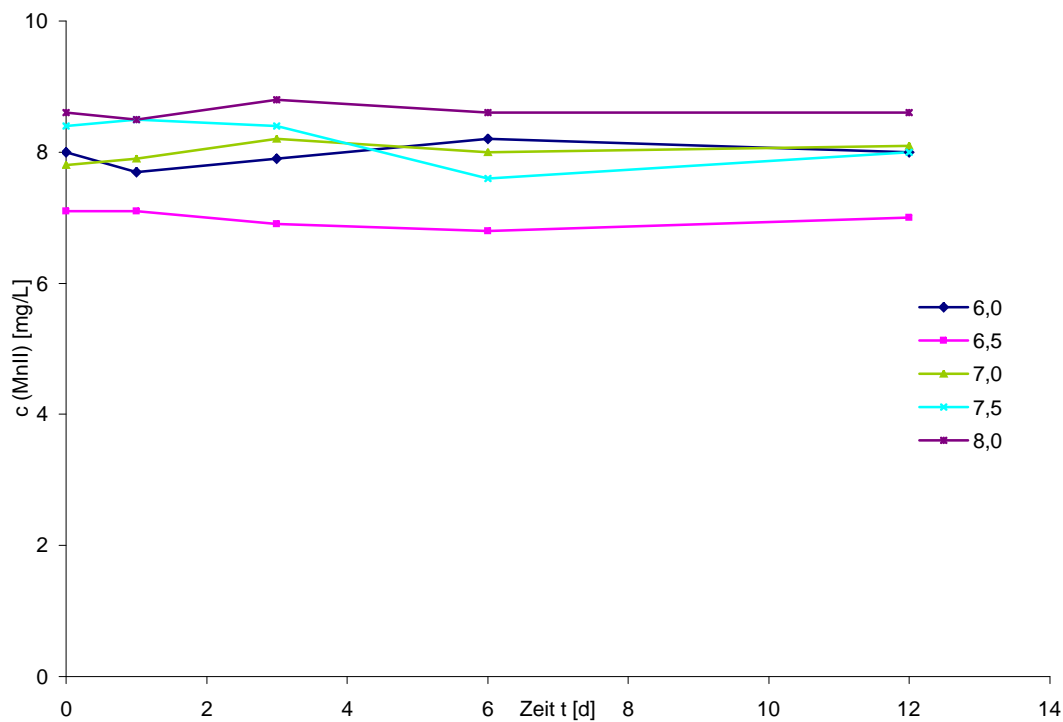


Abb. 33a Zeitlicher Verlauf der Mangankonzentration in einer unbeimpften Kontrolle. Die ManganII-Konzentrationen bleiben nahezu konstant.

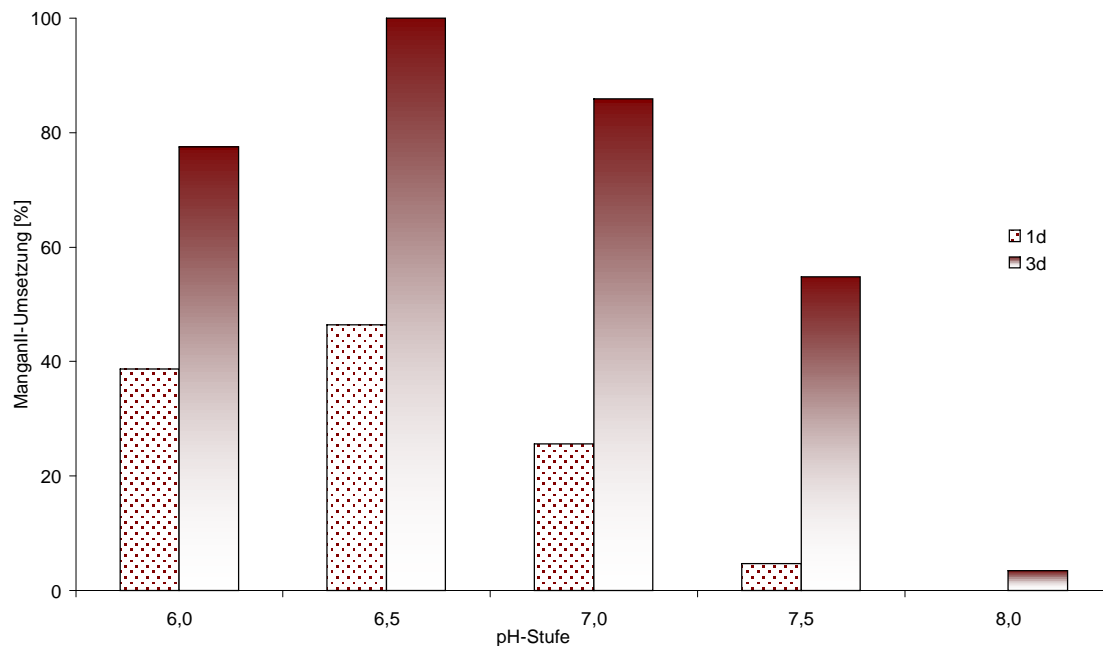


Abb. 34 prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat Th nach 1d und 3d. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5. Nach 3 d ist Medium 6,5 MnII-frei. Deutlich wird auch die Hemmung der Manganoxidation bei erhöhtem pH-Wert.

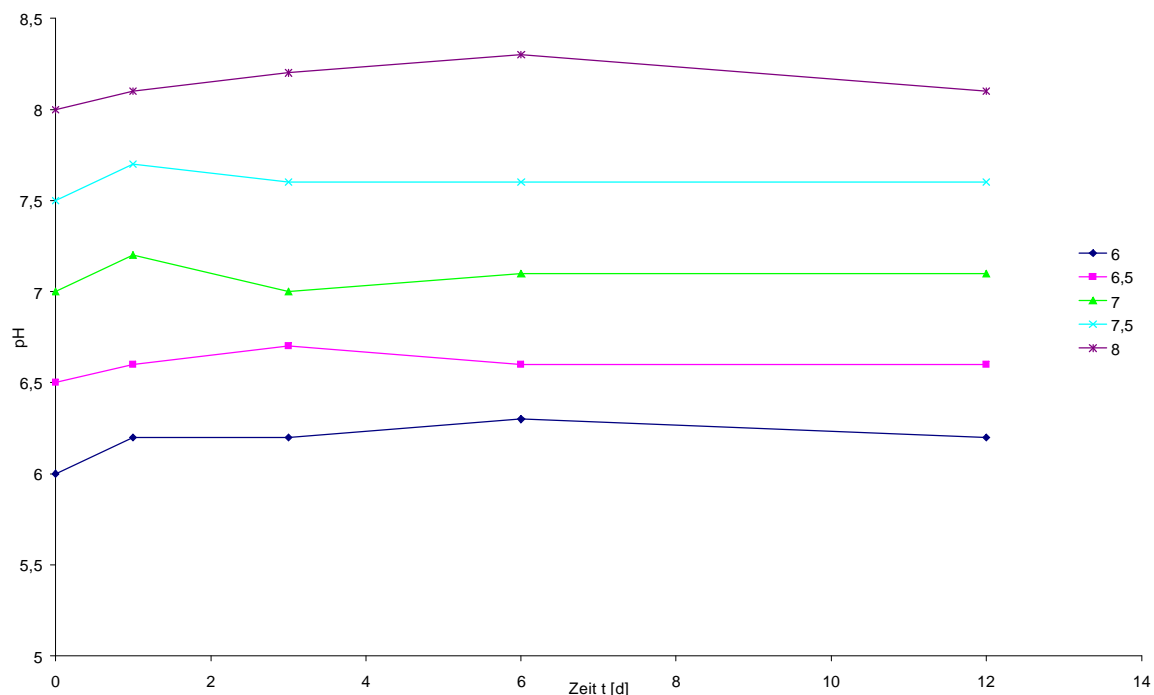


Abb. 35 Zeitlicher Verlauf der pH-Werte. Die pH-Werte bleiben bei Isolat Th im Versuchsverlauf nahezu konstant.

Eine Verschiebung der pH-Werte hat nicht stattgefunden (vgl. Abb. 35). Die Werte bleiben im Versuchsverlauf nahezu konstant. **Die unbeimpfte Kontrolle (vgl. Abb. 33a) zeigt, dass die Manganoxidationsvorgänge tatsächlich auf die**

zugeimpften Isolate zurückzuführen sind. Auf eine Darstellung der unbeimpften Kontrollansätze wird in der Folge verzichtet.

3.9.1.2 Isolat L1 - Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation

Die nicht-scheidenbildende Variante von *L. discophora* zeigt bezüglich der Manganoxidation ebenfalls ein **pH_{opt} bei 6,5** (Vgl. Abb. 36-37). Das Medium pH 7,0 ist erst erheblich später manganII-frei. Schon ab einem pH-Wert von 7,5 tritt eine deutliche Hemmung der Manganoxidation auf. Die Medien pH 7,5 und pH 8,0 zeigen im Versuchszeitraum (12d) keine Manganoxidation. Das Medium 6,0 zeigt zunächst auch eine deutliche ManganII-Abnahme (93% nach sechs Tagen), Die Manganoxidation stagniert allerdings nachfolgend auf diesem Niveau. Die pH-Werte in den Medien bleiben ohne größere Schwankungen im Versuchsverlauf im eingestellten Bereich (nicht dargestellt).

Damit unterscheidet sich Isolat L1 erheblich von der scheidenbildenden Variante von *L. discophora*. Bei Isolat L1 waren in den Medien mit pH7,5 und pH8,0 auch nach 14d keine ManganII-Abnahmen festzustellen. Isolat Th zeigt nach auch bei pH 8,0 eine signifikante ManganII-Abnahme im Versuchsverlauf.

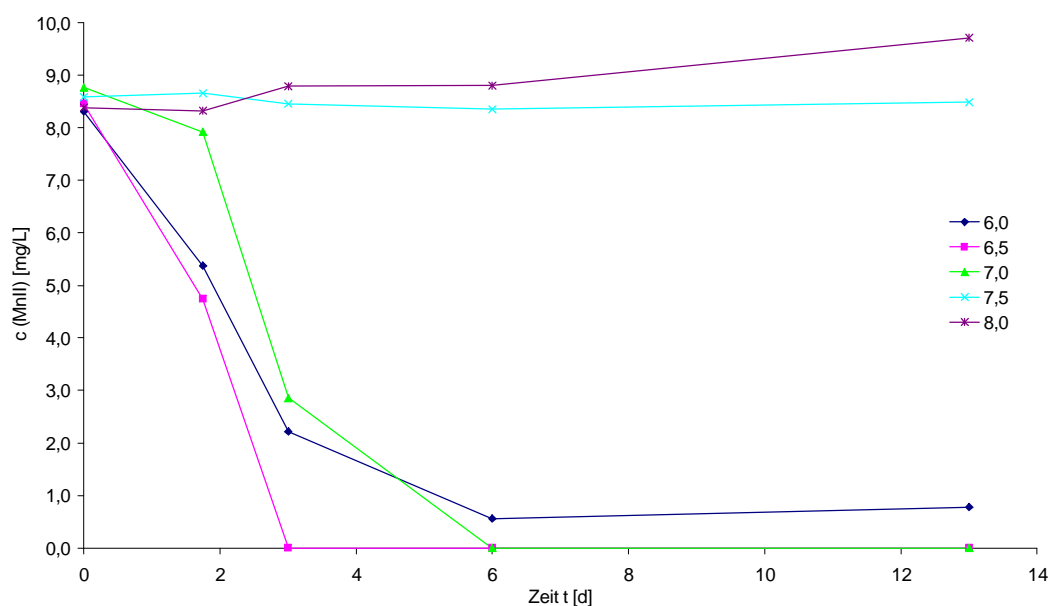


Abb. 36 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Mangankonzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat L1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. Nach 3d ist Medium „pH 6,5“ manganII-frei, nach weiteren 3d Medium „pH 7,0“.

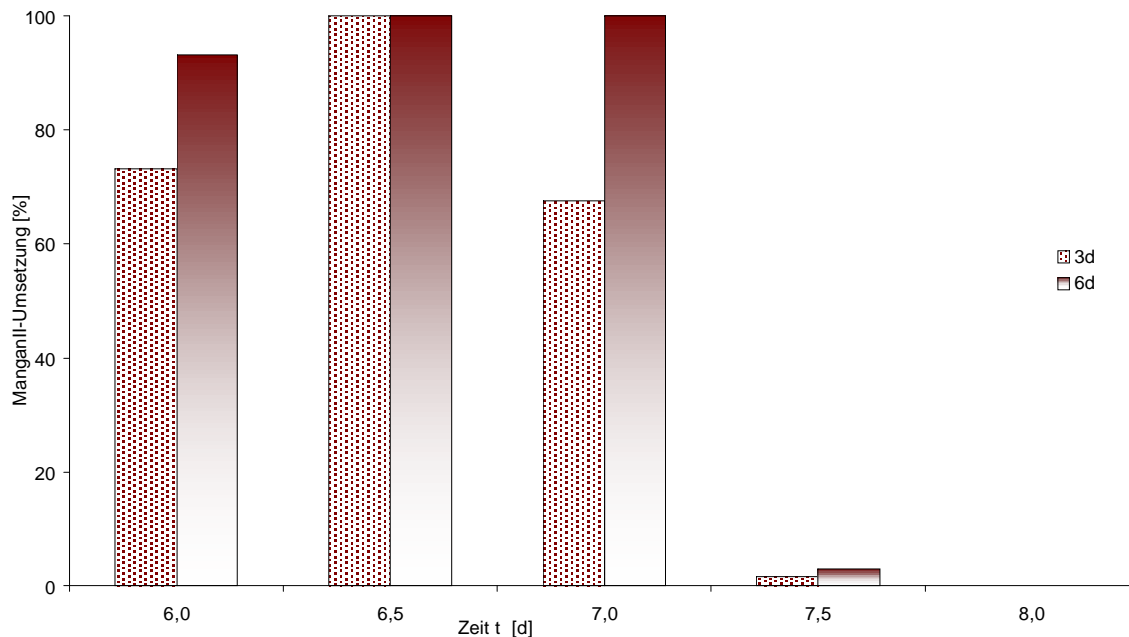


Abb. 37 prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat L1 nach 3d und 6d. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5.

Die Ursache hierfür kann nur in der Bildung von Scheiden durch Isolat Th liegen. **Die an die Scheiden gekoppelte Manganoxidation ist offensichtlich nicht im gleichen Maße pH-abhängig, wie diejenige Manganoxidation, die auf die Haftscheiben zurückzuführen ist.** Dies kann für den technischen Einsatz des Isolats L1 als Starterkultur durchaus relevant werden, da nach Entfernung des im Wasser vorhandenen freien Kohlenstoffdioxids, etwa durch intensive Belüftung, die pH-Werte in den Wässern schnell auf Werte über 7,5 ansteigen können (vgl. 3.10.1 und 3.10.2).

3.9.1.3 Isolat R4 – Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation

Isolat R4 zeigt bereits nach 24h eine vollständige Manganpräzipitation in den Medien 6,5 und 7,0 (vgl. Abb. 38-39). Medium 6,0 zeigt bereits eine über 80%ige Entfernung des löslichen Mangans. Nach 3d ist sowohl Medium pH6,0 , als auch Medium pH7,5 frei von ManganII. Doch auch hier ist die Manganoxidation bei höheren pH-Werten deutlich verzögert bzw. gehemmt. Erst nach 12d ist das ManganII im Medium pH 8,0

zu über 50% entfernt. Schwankungen der eingestellten pH-Werte spielen auch hier keine Rolle (nicht dargestellt).

Dennoch wird deutlich, dass die Manganoxidation durch Isolat R4 **erheblich weniger vom pH-Wert abhängig** ist, als bei den Isolaten Th und L1. Aber auch bei Isolat R4 kann die Anhebung des pH-Wertes bei der Aufbereitung von Trink- oder Mineralwässern die Manganoxidation nicht zwangsläufig beschleunigen. Die hier untersuchten Entmanganungen durch *Leptothrix*-Species würden durch eine deutliche Anhebung des pH-Wertes eher gehemmt.

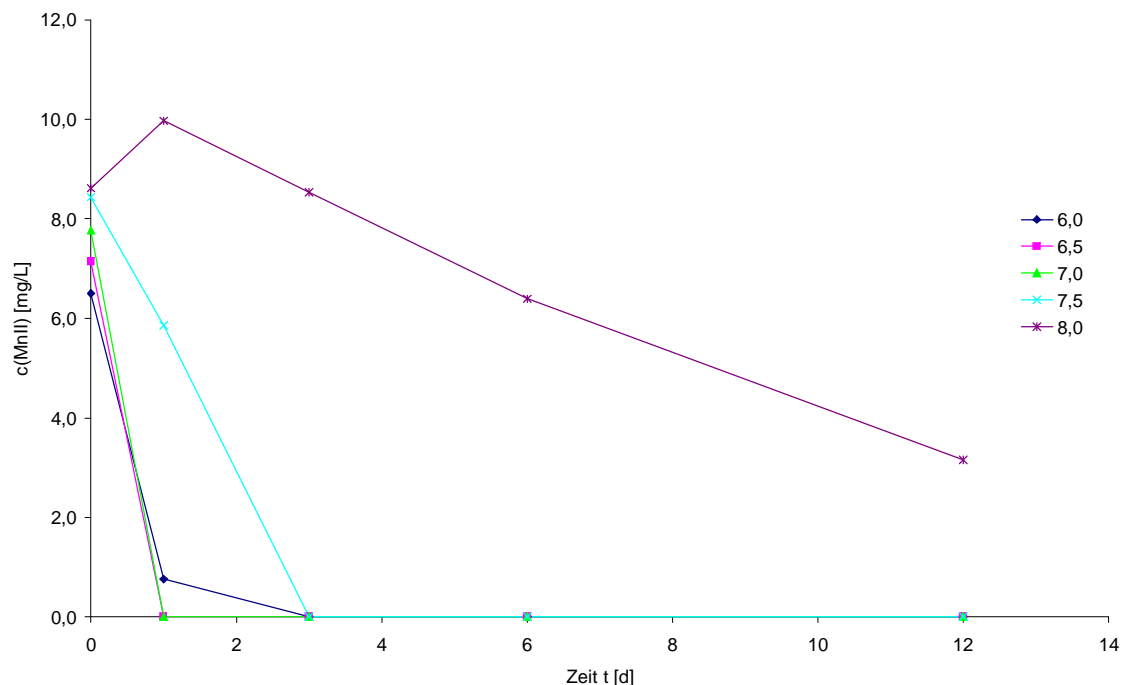


Abb. 38 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Mangankonzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat R4 bei verschiedenen eingestellten pH-Werten. Nach 1d ist Medium pH 6,5 und Medium pH 7,0 manganII-frei, nach 3d Medium pH 6,0 und Medium pH 7,5.

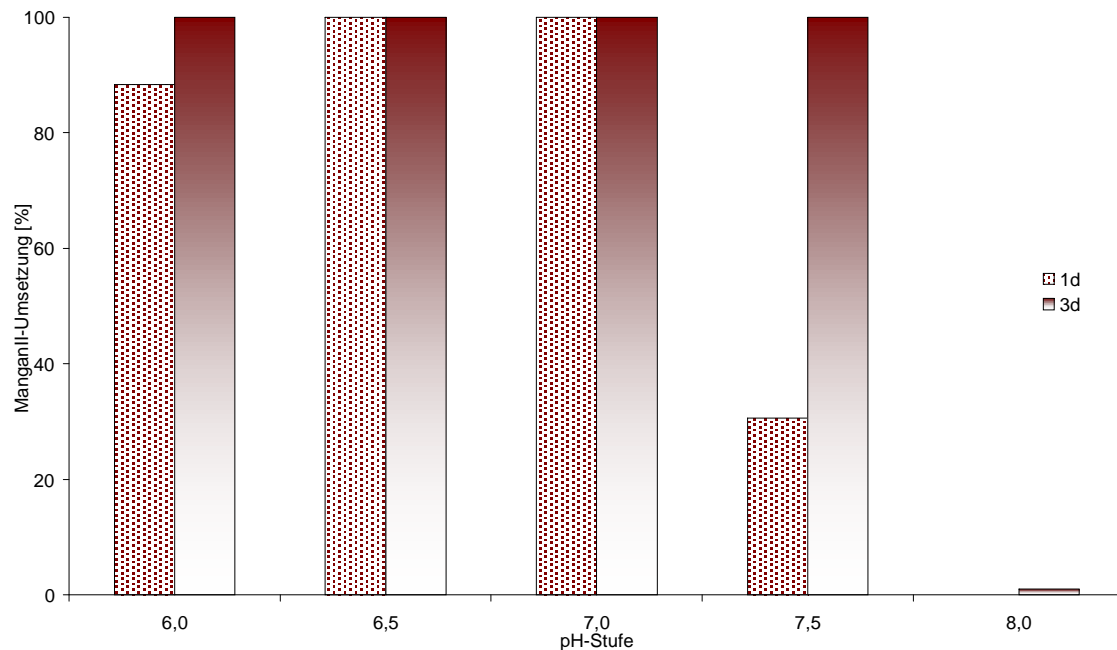


Abb. 39 prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat R4 nach 1d und 3d. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5-7,0. Nach 1d sind die Medien pH 6,5 und pH 7,0 manganII-frei.

3.9.1.4 Isolat KIN - Der Einfluss des pH-Wertes auf die Manganoxidation

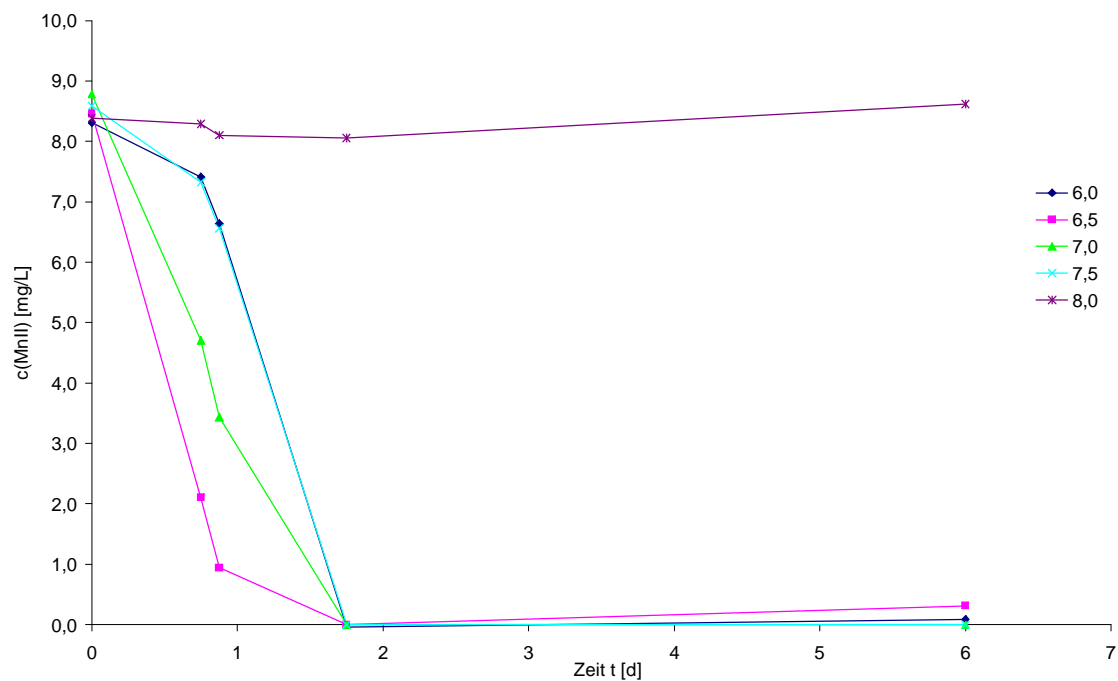


Abb. 40 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Mangankonzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat KIN bei verschiedenen eingestellten pH-Werten. Nach 42h sind vier der fünf eingesetzten Medien manganII-frei.

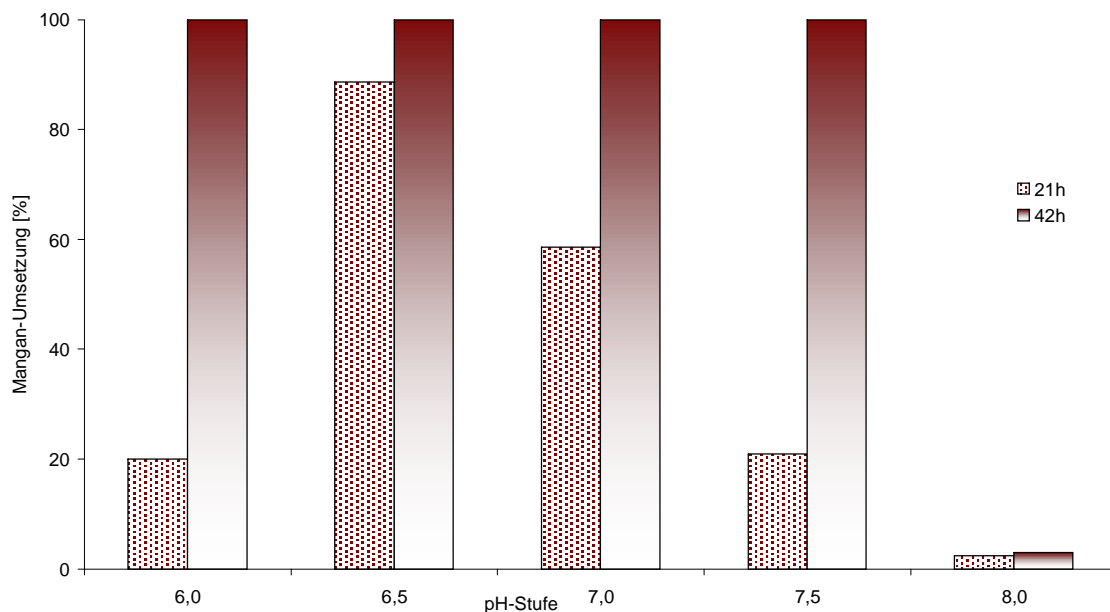


Abb. 41 prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat KIN nach 21 und 42h. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5. Nach 42h sind jedoch auch die Medien mit den pH-Werten 6,0; 7,0 und 7,5 manganII-frei. Im Medium mit einem pH-Wert von 8,0 tritt eine deutliche Hemmung der Manganoxidation ein.

Das Isolat KIN zeigt, wie die Isolate der Gattung *Leptothrix*, ein **pH-Optimum bei pH6,5** bezüglich der Manganoxidation. Im entsprechenden Medium ist das ManganII bereits nach 21h zu über 80% zu ManganIV umgesetzt (Vgl. Abb. 40-41), Im Medium pH 7,0 sind zu diesem Zeitpunkt erst ca. 60% umgesetzt, in den anderen Medien noch weniger (6,0 und pH 7,5 je ca. 20%, pH 8,0 <<10%). Nach insgesamt 42h war die quantitative Entfernung des ManganII in allen Medien abgeschlossen, mit der Ausnahme des Mediums pH 8,0. Hier zeigt sich bis zum Versuchsende nach sechs Tagen keinerlei Manganoxidationstätigkeit durch Isolat KIN. Die Manganoxidation ist offensichtlich bei diesem pH-Wert gehemmt. Die zu Versuchsbeginn eingestellten pH-Werte blieben über den Versuchszeitraum mit minimalen Schwankungen konstant (nicht dargestellt).

Die These, dass ein erhöhter pH-Wert im Medium die biologische Manganoxidation fördert, lässt sich also auch für Isolat KIN (*Pseudomonas manganoxidans*) im Batch-Ansatz nicht belegen. **Im Gegenteil verzögern oder hemmen pH-Werte ab 7,5 unter den gegebenen Bedingungen die natürlich-biologische Manganoxidation.**

3.9.1.5 Isolat D1 - Der Einfluss des pH-Werts auf die Manganoxidation

Isolat D1 zeigt sich unter den Bedingungen im Batch-Ansatz als langsamer Manganoxidierer.

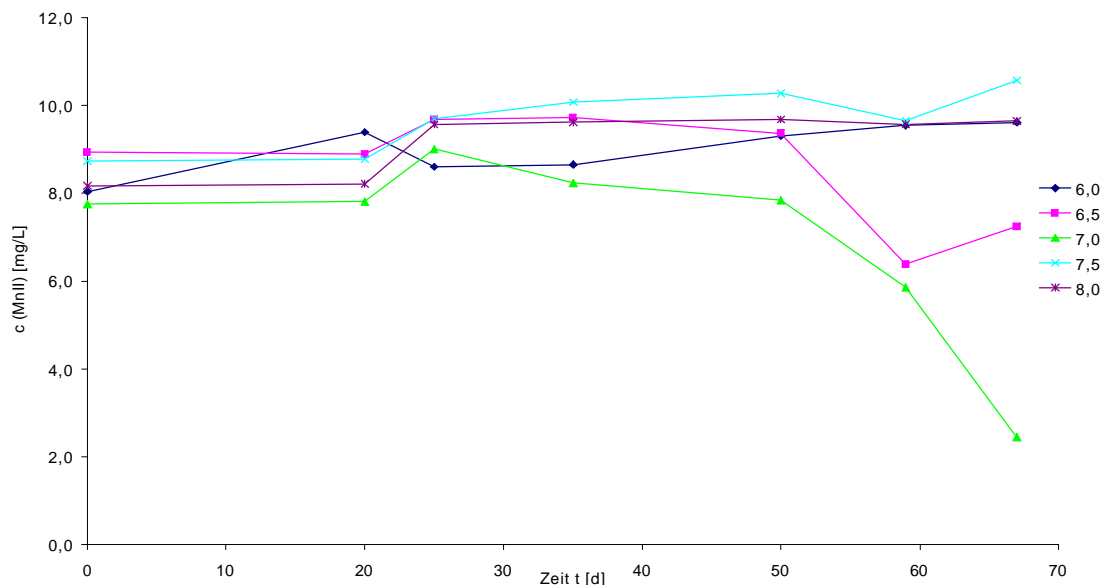


Abb. 42 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Mangankonzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat D1 bei verschiedenen pH-Werten. Lediglich die Medien 7,0 und 6,5 zeigen Manganoxidationstätigkeit.

Der pH-Wert ist offenbar nicht für das späte Auftreten der Manganoxidation durch Isolat D1 ursächlich. Die Manganoxidation des Isolats D1 kann erst nach einer Zeit von über 50 Tagen quantifiziert werden. Danach zeigt sich jedoch ein pH-Wert von 7,0 als optimal für die Manganoxidation (vgl. Abb. 42-43). Deutlich schwächer ist die Manganoxidation bei pH 6,5; die Medien mit den pH-Werten 6,0, 7,5 und 8,0 zeigen keine Manganoxidation im Versuchszeitraum. Die pH-Werte bleiben auch hier im eingestellten Bereich (nicht dargestellt) konstant. Der pH-Wert spielt für die Manganoxidation der untersuchten Isolate eine zumindest mitentscheidende Rolle.

Der hemmende Effekt von pH-Werten über 7,5 wird bei allen untersuchten Isolaten deutlich. Alle zeigen eine optimale Manganoxidation zwischen 6,5 und 7,0. Die Aussage einiger Autoren [z.B. GAGE ET AL. 2001], dass eine mikrobielle Manganoxidation durch eine pH-Anhebung stimuliert werden könne, ist damit zwar nicht widerlegt, ist aber keinesfalls auf alle Arten natürlich-biologischer Manganoxidentationen anzuwenden. Die hier untersuchten Isolate benötigen für eine

optimale Manganoxidation ein neutrales bis leicht saures Milieu. Diese Werte entsprechen auch den an den natürlichen Standorten der Isolate.

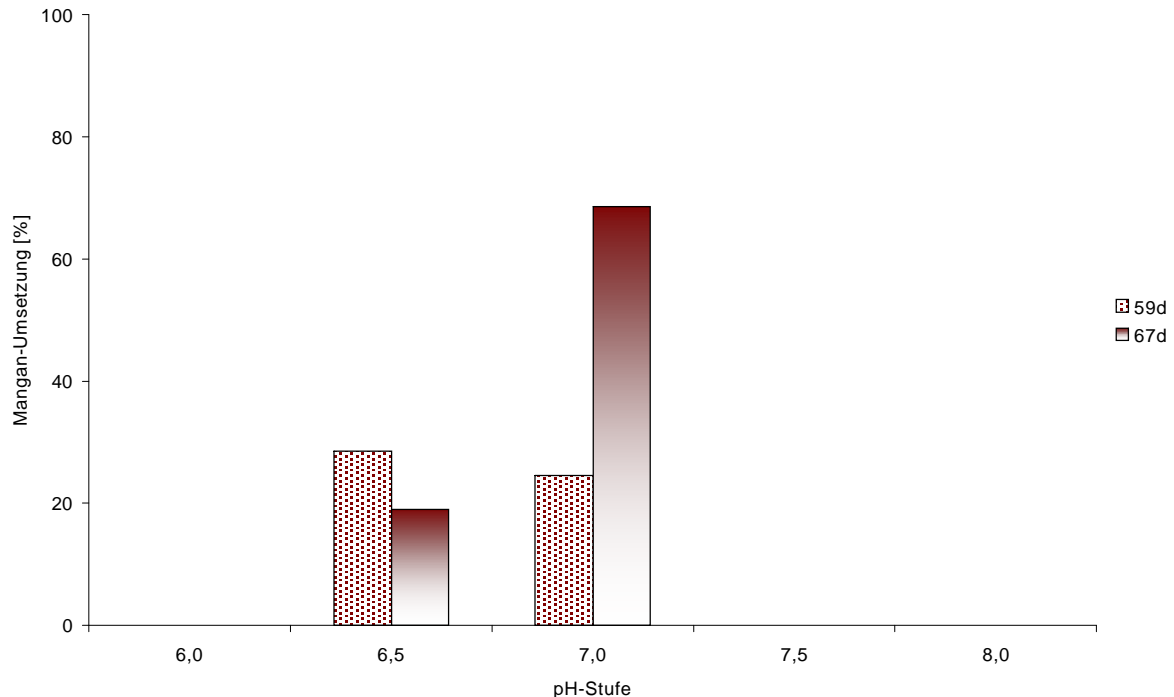


Abb.43 prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat D1 nach 59d und 67d. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,0. Unterhalb von pH 6,5 und über pH 7,0 ist keine Manganoxidation feststellbar.

gefundenen Werten, die allesamt zwischen 6,7 und 7,1 liegen. Sollte dennoch eine pH-Verschiebung zur Manganoxidation durch die getesteten Isolate beitragen, so bleibt diese auf den unmittelbaren Bereich um die Zellen herum beschränkt. Aus dem Stabilitätsdiagramm für Manganionen (vgl. Abb. 1) wird deutlich, dass dies zumindest nicht unwahrscheinlich ist. Denkbar ist auch eine Verschiebung des Redoxpotentials im unmittelbaren Zellbereich.

3.9.2 Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Die Sauerstoffkonzentration spielt bei den Vorgängen der Eisen- und Manganoxidation eine zentrale Rolle. So ist der eisenoxidierende Mikroorganismus *Gallionella ferruginea* als Gradientenorganismus mit einer ausgeprägten Microaerophilie bekannt [Hanert 1969]. Bekannt ist weiterhin, dass der manganoxidierende Organismus *Metallogenium personatum* nur in bestimmten Gewässertiefen bei spezifischen Sauerstoffgehalten zur Massentwicklung kommt [SCHMIDT ET

AL. 1976]. Mouchet [MOUCHET 1992] geht in seinen Arbeiten von einer optimalen Manganoxidation in der technischen Anwendung von $>5\text{mg/L}$ aus. Okazaki [OKAZAKI 1997] gibt für die Manganoxidation eines *Pseudomonas*-Isolats ein Sauerstoffoptimum von 26% Sättigung an (ca. $2,6\text{ mg/L O}_2$) und auch Schweisfurth [SCHWEISFURTH 1976] gibt an, dass eine maximale Sauerstoffversorgung nicht eine maximale Manganoxidation bedeuten muss.

Ein Zusammenhang zwischen optimalen Wachstumsbedingungen und optimalen Bedingungen für die Manganoxidation muss daher auch für die hier zu untersuchenden Isolate nicht zwangsläufig bestehen.

Für die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Manganoxidation von der Sauerstoffkonzentration werden luftdicht verschließbare Flaschen (vgl. Abb. 49) mit dem flüssigen, gepufferten Basismedium gefüllt und nach der Sterilisation beimpft. Anschließend wird der Gasraum mit Stickstoff für drei Minuten gespült, um den Luftsauerstoff zu entfernen. Die Medien wurden wie in 2.1.2 dargestellt, inkubiert.

Die Manganoxidation wurde bei vier Sauerstoffkonzentrationen untersucht:

„0“ (anaerober Ansatz); „1“ (Im Gasraum wurden 1% der Sauerstoffkonzentration der Umgebungsluft eingestellt); „10“ (Im Gasraum wurde 10% der Sauerstoffkonzentration der Umgebungsluft eingestellt); „100“ (voll aerober Ansatz mit Umgebungsluft ohne weitere Manipulationen);

3.9.2.1 Isolat Th - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Untersuchungen von Emerson [EMERSON ET AL. 1992] haben gezeigt, dass sich die scheidenbildende Art *Leptothrix discophora* bevorzugt unter microaeroben Bedingungen isolieren lässt.

Die Ergebnisse für Isolat Th zeigen eindeutig, dass **die Manganoxidation ohne den Einfluss von Luftsauerstoff im Versuchszeitraum nicht stattfindet** (vgl. Abb. 44-45). Unter den Bedingungen einer 10%igen Sauerstoffsättigung erfolgt die Manganoxidation in den ersten 48h bereits quantitativ, bei voll aeroben Bedingungen erst nach 4d. Aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen (Abb.46-48) wird deutlich, dass **bei microaeroben Bedingungen die Scheidenbildung deutlich gegenüber den voll aeroben Bedingungen verbessert ist. Die Scheiden sind**

erheblich länger ausgebildet. Ohne Sauerstoff findet keine Scheidenbildung statt (Abb. 46). Der pH-Wert bleibt in allen Ansätzen im eingestellten Bereich stabil und hat somit keinen Einfluss auf die Manganoxidation (nicht dargestellte Werte).

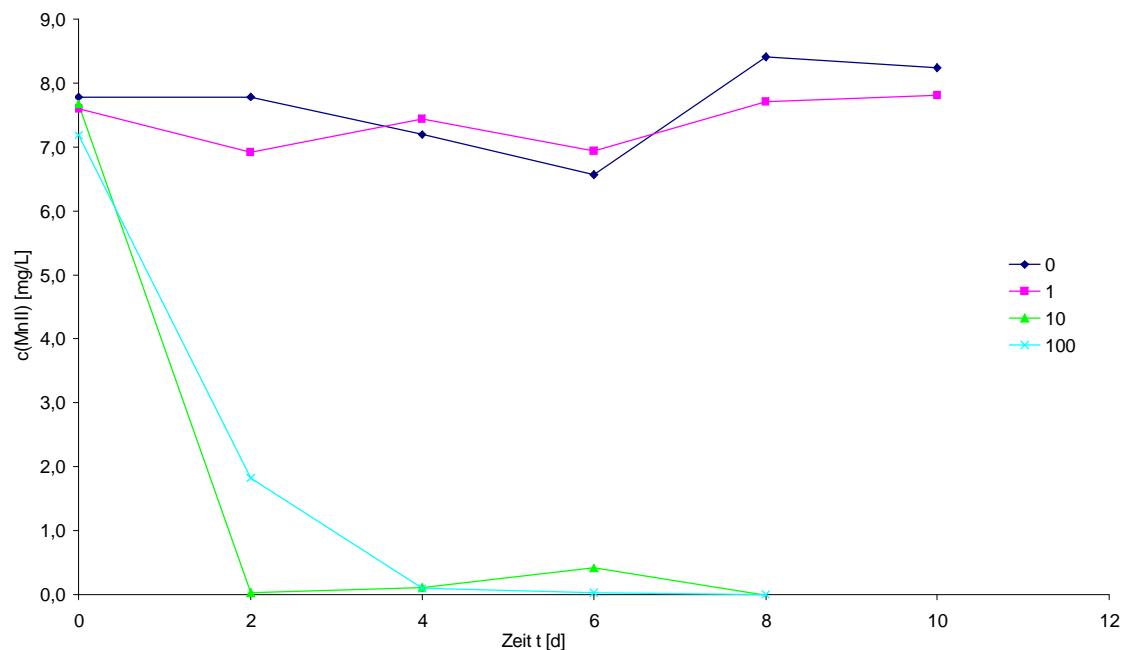


Abb. 44 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der ManganII-Konzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat Th bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Manganoxidation findet im Bereich microaerob bis höherer Sauerstoffkonzentrationen (10% und 100% Sättigung) statt.

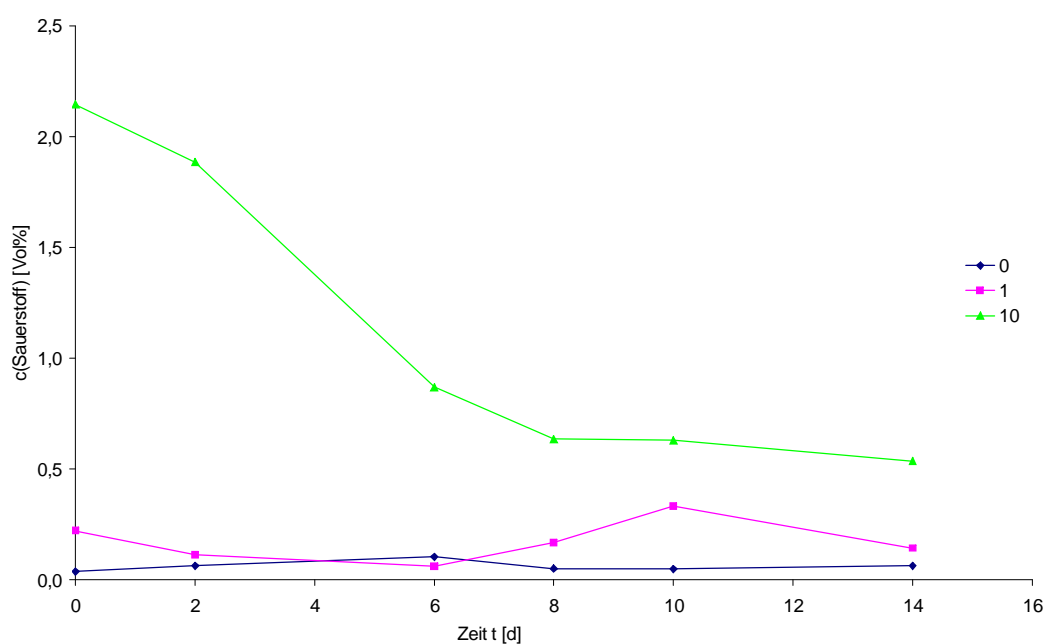


Abb. 45 Isolat Th - Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffgehalte in den microaeroben und anaeroben Ansätzen

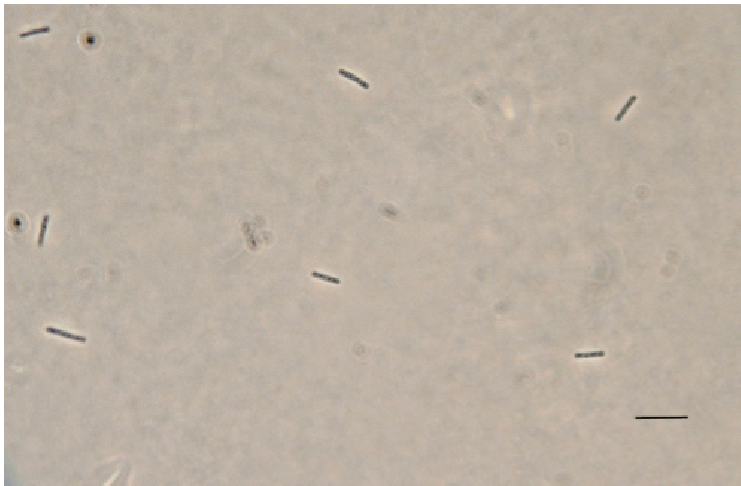


Abb. 46 Isolat Th nach 2d Sauerstoffkonzentrationsstufe „0“
Die Zellen liegen frei vor – keine Scheidenbildung. Balken = 10µm

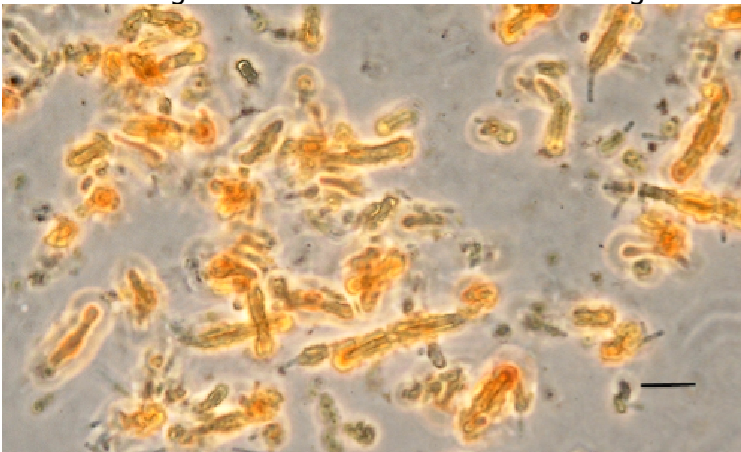


Abb. 47 Isolat Th nach 2d Sauerstoffkonzentrationsstufe „10“
Die gebildeten – und verockerten – Scheiden sind ca. 30-60µm lang. Balken = 10µm

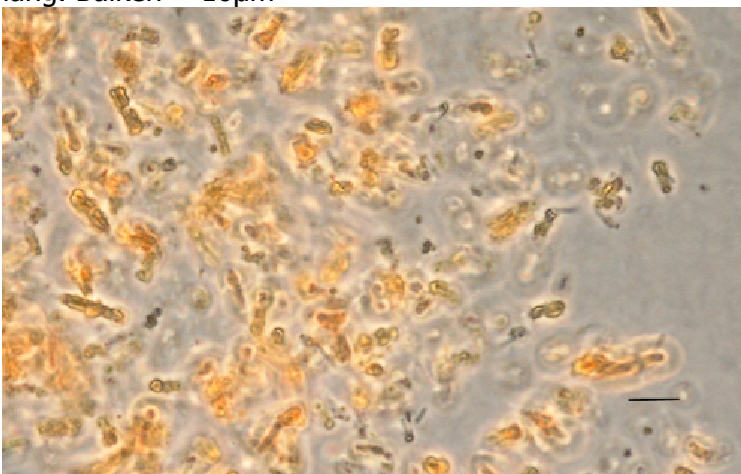


Abb.48 Isolat Th nach 2d Sauerstoffkonzentrationsstufe „100“
Die gebildeten Scheiden sind mit 10-30µm deutlich kürzer als im microaeroben Ansatz. Balken = 10µm

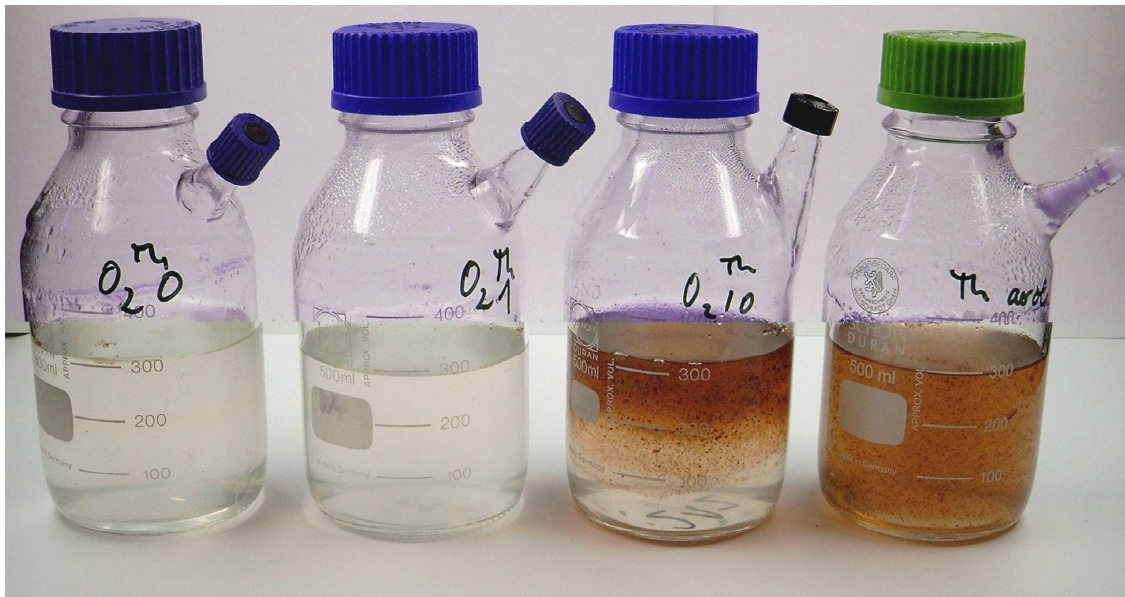


Abb. 49 Batch-Ansätze zu Ermittlung der Sauerstoffabhängigkeit der Manganoxidation durch Isolat Th. v.l.: keine Sauerstoffzugabe (anaerober Ansatz), 1% Sättigung; 10% Sättigung, 100% Sättigung (voll aerob)

3.9.2.2 Isolat L1 - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Isolat L1 unterscheidet sich in seiner Charakteristik von Isolat Th. Isolat L1 zeigt **die schnellste Manganoxidation bei voller Sauerstoffsättigung** im Medium (vgl. Abb. 50). Die ManganII-Entfernung aus dem Medium ist hier nach 10d quantitativ erfolgt. Bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen erfolgt im Versuchszeitraum keine quantitative Manganoxidation. Die Manganoxidation ist bei Isolat L1 räumlich an die ausgebildeten Haftscheiben gebunden (vgl. Abb. 52-53), deren optimale Ausbildung offenbar mit einer Sauerstoffkonzentration im Bereich der Sauerstoffsättigung korreliert. Der pH-Wert spielt keine signifikante Rolle. Er bleibt bei allen untersuchten Sauerstoffkonzentrationen nahezu konstant im zuvor eingestellten Bereich (pH 6,6-6,7) (nicht dargestellt). Auffällig ist, dass das Isolat L1 der einzige getestete Organismus ist, der **bei einer Sauerstoffsättigung von 1% eine nennenswerte Manganoxidation** durchführt. Die ManganII-Konzentration sinkt im Versuchszeitraum von ca. 8mg/L auf ca. 1mg/L. Ein Sauerstoffzutritt ins Versuchsgefäß kann ausgeschlossen werden, da die Sauerstoffkonzentrationen im Versuchszeitraum nahezu konstant bleiben (vgl. Abb.51). Die Manganoxidation resultiert auch hier aus der Bildung von Haftscheiben,

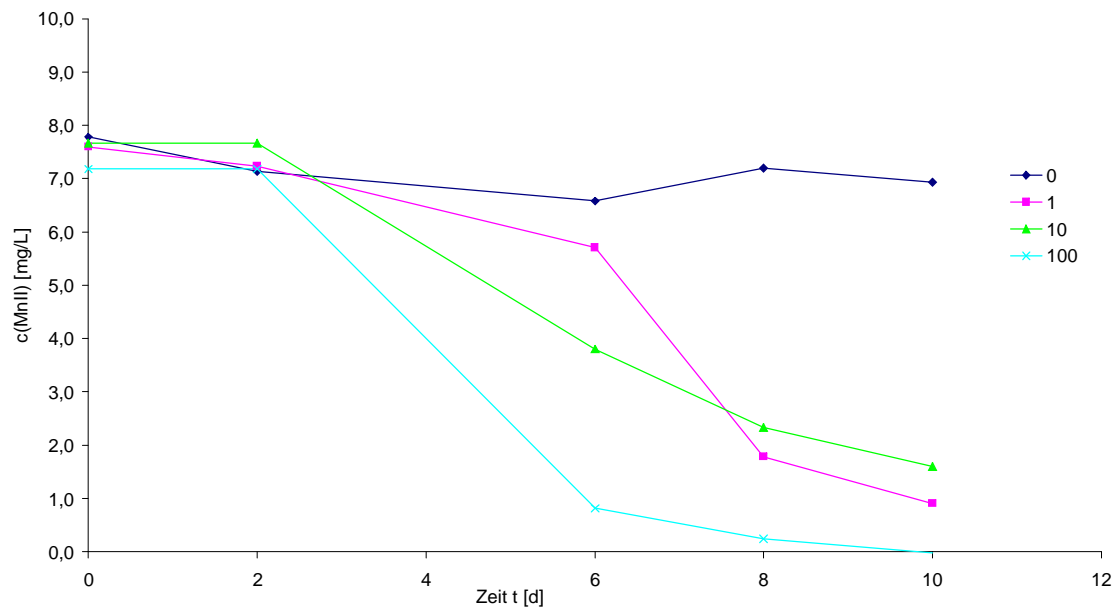


Abb. 50 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der ManganII-Konzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat L1 bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

die zwar verzögert einsetzt, aber dennoch für die Manganoxidation verantwortlich ist, wie das mikroskopische Bild zeigt.

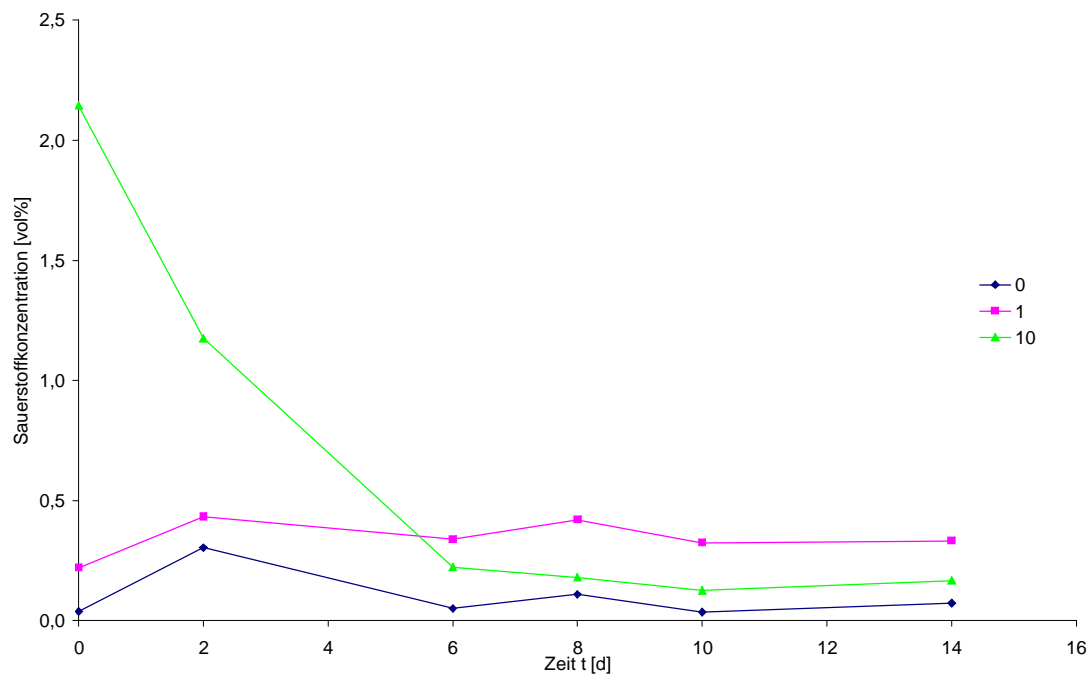


Abb. 51 Isolat L1 – Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen



Abb. 52 Isolat L1 – nach 2d Inkubation: Bei 1% Sauerstoffsättigung keine Bildung von Scheiden, Haftscheiben oder Manganinkrustationen. (Balken = 10µm)



Abb. 53 Isolat L1 – nach 2d Inkubation bei 10% Sauerstoffsättigung. Es zeigt sich jedoch zusätzlich eine Flockenbildung mit interner Manganoxidation (Balken = 10µm)

3.9.2.3 Isolat R4 – Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Auch Isolat R4 zeigt im anaeroben, sowie im unteren microaeroben Bereich keine signifikante Manganoxidation (vgl. Abb. 54). Vergleichbar mit Isolat Th erfolgt auch hier die Manganoxidation bevorzugt im oberen microaeroben Bereich (Ansatz „10%“). **Die Scheiden und Haftscheiben sind offensichtlich der primäre Ort der Manganoxidation und die Bildung von Manganoxiden unter microaeroben Bedingungen bevorzugt.** Es zeigt sich wie bei Isolat Th eine

kräftigere und längere Ausbildung des Scheidenmaterials (Länge einer Scheide ca. 30-40µm bei microaeroben Bedingungen im Vergleich zu 20µm bei voll aeroben Bedingungen (vgl. Abb. 55-57)). Wie bei den anderen Isolaten kann auch hier ein Einfluss des pH-Wertes ausgeschlossen werden (nicht dargestellt).

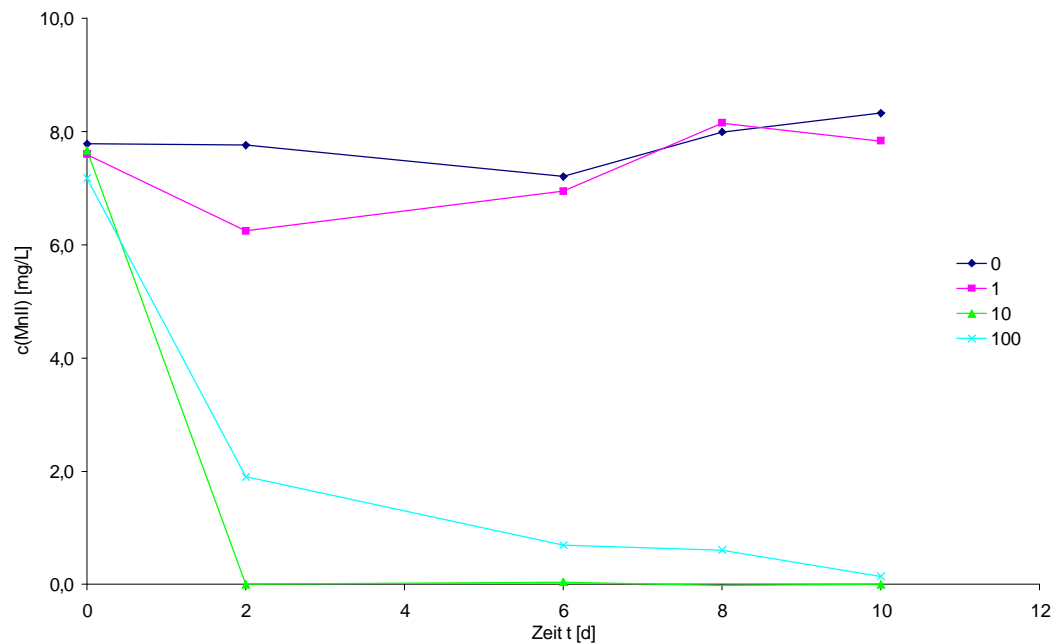


Abb. 54 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der ManganII-Konzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat R4 bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Isolat R4 zeigt bei 10%iger Sauerstoffsättigung die schnellste Manganoxidation.

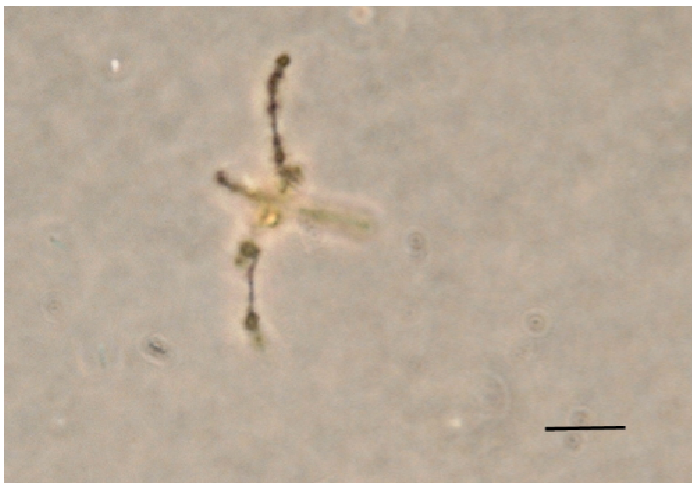


Abb. 55 Isolat R4 - 1% der Atmosphärenbedingungen (Balken = 10µm)



Abb. 56 Isolat R4 - 10% der Atmosphärenbedingungen (Balken = 10µm)

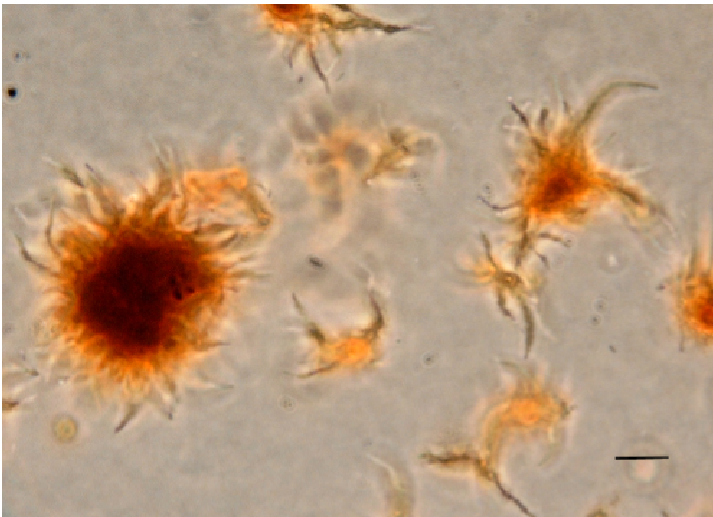


Abb. 57 Isolat R4 100% der Atmosphärenbedingungen (Balken = 10µm)

3.9.2.4 Isolat KIN – Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Isolat KIN zeigt sowohl im voll aeroben, als auch im oberen microaeroben Bereich eine quantitative Manganoxidation nach 48h. Im unteren microaeroben Bereich findet hingegen keine Umsetzung zu ManganIV statt (vgl. Abb. 58).

Der pH-Wert spielt keine signifikante Rolle. Er bleibt bei allen untersuchten Sauerstoffkonzentrationen nahezu konstant im zuvor eingestellten Bereich (pH 6,6-6,7). Der anaerobe Ansatz zeigt bis zum Versuchsende (15d) keine Abnahme der MnII-Konzentration bzw. eine Braunfärbung des Mediums.

Für die Manganoxidation von Isolat KIN ist Sauerstoff ein entscheidender Faktor. Eine anaerobe Manganoxidation findet auch hier im Versuchszeitraum nicht statt.

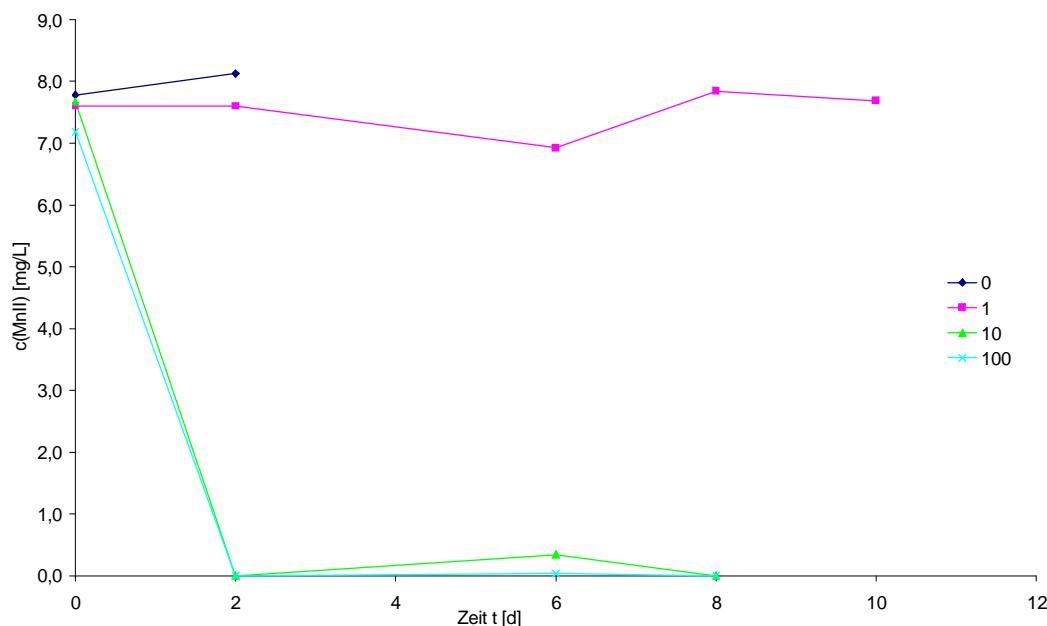


Abb. 58 Zeitlicher Verlauf der Abnahme der ManganII-Konzentration im gepufferten Basismedium durch Isolat KIN bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Manganoxidation findet ohne Sauerstoff praktisch nicht statt.

3.9.2.5 Isolat D1 - Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Manganoxidation

Isolat D1 zeigt bis zum Abbruch des Versuches nach 60d keine Anzeichen von Manganoxidation. Dennoch war Isolat D1 noch immer in der Lage, ManganII zu ManganIV zu oxidieren, wie ein Rückimpfversuch auf Festmedium zeigte (nicht dargestellt). Offenbar ist aber durch die Einstellung spezifischer Sauerstoffkonzentrationen im Medium keine signifikante Beschleunigung der Manganoxidation zu erreichen.

Eine Sauerstoffkonzentration deutlich unter der Sauerstoffsättigung (10% des Atmosphärendrucks) ist für die Isolate R4, Th und KIN unter den eingestellten Bedingungen für eine Manganoxidation ausreichend, um in kurzer Zeit, das im Medium enthaltene ManganII zu ManganIV zu oxidieren. Ein weiterer Abfall der Sauerstoffkonzentration im Medium muss aber vermieden werden, um ein Ausbleiben

weiterer Manganoxidationsaktivität zu vermeiden. **Für die technische Anwendung einer mikrobiellen Manganoxidation mit den hier untersuchten Isolaten wäre aber die Sauerstoffsättigung zu bevorzugen.** Die geringfügig besseren Ergebnisse im microaeroben Milieu treten gegenüber einer technisch wesentlich einfacher zu steuernden Prozesstechnik der vollen Sauerstoffsättigung in den Hintergrund. **Das Risiko eines Stillstands in der Manganoxidation durch einen zu geringen Sauerstoffpartialdruck** im Medium überwiegt die etwas beschleunigte Manganoxidation im microaeroben Milieu.

3.9.3. Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

Im Rahmen der Anreicherung und Isolierung der vorliegenden Isolate trat immer wieder das Phänomen auf, dass bestimmte Organismen auf organikreichen Medien keinerlei Manganoxidationstätigkeit zeigten, in organikärmeren Medien hingegen bereits nach kurzer Zeit die für Braunstein typische Braun/Schwarzfärbung. Schmidt [SCHMIDT 1979] erkannte bei der Untersuchung seines Stammes G75 (*Siderocapsa geminata*), dass Organikkonzentrationen über 250mg/L die Manganoxidation hemmen und auch Schweisfurth [SCHWEISFURTH 1976] gibt als optimale Organikkonzentrationen für die Manganoxidation Werte zwischen 10 und 1000mg/L, insbesondere aber zwischen 100 und 200mg/L an. Glucose hemmt nach seinen Untersuchungen die Manganoxidation oberhalb von 100mg/L.

In den Vorversuchen (vgl. 3.6.1) zeigte sich, dass diese Beobachtungen durchaus einer Regelmäßigkeit folgen könnten. Eine Quantifizierung dieser Beobachtungen blieb in den Vorversuchen jedoch aus. Zur quantitativen Untersuchung wurde Hefeextrakt als Organikquelle genutzt, da es im Basismedium, sowie in den wichtigsten Isolierungsmedien Anwendung findet.

Als Organikkonzentrationen im flüssigen, gepufferten Basismedium wurden gewählt:

- 0: kein Zusatz
- A: 0,5mg/L
- B: 5 mg/L
- C: 50 mg/L
- D: 250 mg/L
- E: 2500 mg/L

3.9.3.1 Isolat Th – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

Für Isolat Th zeigt sich ein deutliches Optimum bezüglich der ManganII-Umsetzung bei mittleren Hefeextraktgehalten (50-250ppm). Bei niedrigen Organikkonzentrationen kann offenbar die Synthese von Scheidenmaterial nicht oder nur sehr begrenzt durchgeführt werden. **Höhere Organikgehalte** (Stufe E mit 2,5g/L) **hemmen** allerdings ebenfalls die MnII-Entfernung aus den Flüssigmedien.

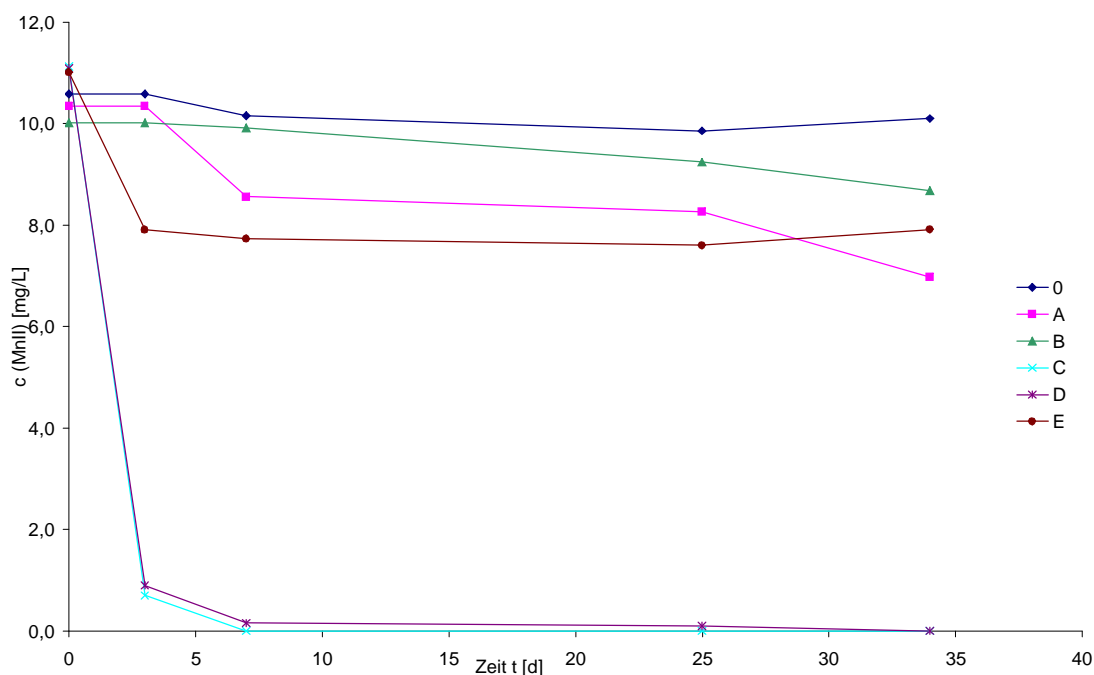


Abb. 59 Isolat Th - Manganoxidation in Abhängigkeit vom Organikgehalt des Mediums. Die Manganoxidation findet bevorzugt im Bereich mittlerer Organikkonzentrationen statt (50-250mg/L).

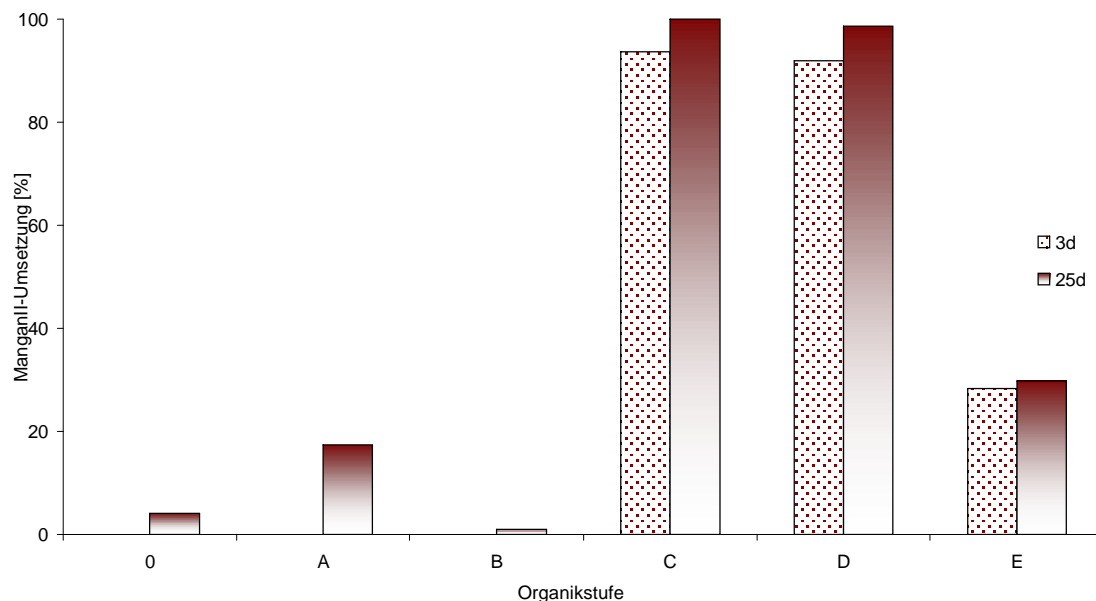


Abb. 60 Prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat Th nach 3d bzw. 25d. Es ist ein deutliches Optimum bei den Organikstufen C und D erkennbar. Durch zu hohe Organikgehalte (Stufe E) tritt eine Verzögerung der Manganoxidation ein.

Das Wachstum wird hingegen nicht gehemmt, wie mikroskopische Untersuchungen der angesetzten Kulturen belegen. Es wird bei Stufe E kein Scheidenmaterial mehr gebildet, was ursächlich für die unzureichende Manganoxidation sein dürfte. Der pH-Wert bleibt im jeweils eingestellten Bereich stabil, so dass auch hier eine Hemmung der Manganoxidation durch eine pH-Verschiebung ins Basische ausgeschlossen werden kann. Die Lage des Optimums liegt bei *L. discophora* nicht überraschend. Kinzinger [KINZINGER 1987] konnte nachweisen, dass bei **L. discophora die Manganoxidation an das Wachstum gekoppelt** ist. Ein eingeschränktes, bzw. ein fehlendes Wachstum muss daher mit einer eingeschränkten oder fehlenden Manganoxidation korrelieren. Da in den Medien 0, A und B allenfalls Spuren organischen Materials vorhanden sind und **L. discophora heterotroph** ist, fehlen in diesen Medien die C-Quellen zur Biomasseproduktion, damit zur Produktion von Haftscheiben, Scheiden und letztendlich zur Manganoxidation.

3.9.3.2 Isolat L1 - Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

Das Organikoptimum für die Manganoxidation sollte für das Isolat L1 ähnlich liegen wie für Isolat Th bei ca. 50mg/L und 250 mg/L (vgl. Abb. 61-62). Es ist jedoch deutlich erkennbar, dass die Manganoxidation bei Isolat L1 deutlich langsamer verläuft, als bei Isolat Th. **Die Scheiden sind bei *L. discophora* der Haupt-, aber nicht der alleinige Ort für die Manganoxidation. Diese findet auch an den Haftscheiben statt,** die im mikroskopischen Bild für die nicht-scheidenbildende Variante von *L. discophora* reichlich zu finden sind. Während Isolat Th bereits nach 5-7 Tagen eine vollständige Entmanganung in den Batch-Ansätzen zeigt, ist dies bei Isolat L1 unter den gegebenen Bedingungen erst nach mehreren Wochen der Fall.

Die Manganoxidation im Medium E wird nicht mit in die Betrachtungen einbezogen, da hier der pH-Wert auf über 8 angestiegen ist. Die Manganoxidation ist hier anteilig als chemisch zu betrachten.

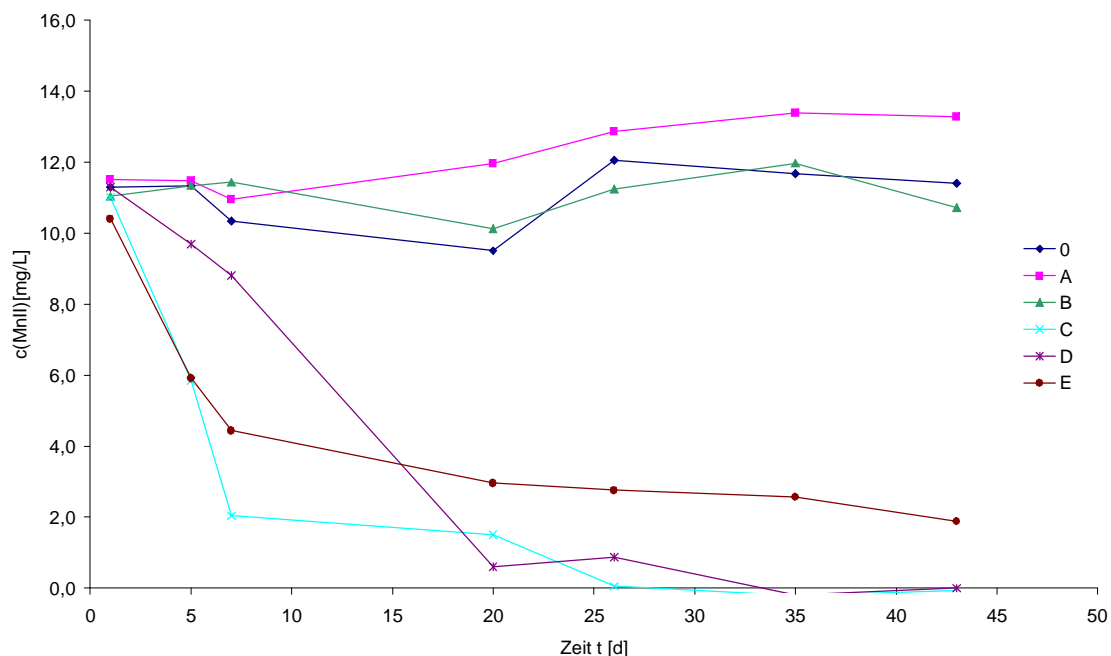


Abb. 61 Abhängigkeit der Manganoxidation vom Organikgehalt im Medium. Erst ab Organikkonzentrationen von 50mg/L und mehr findet eine Manganoxidation im größeren Umfang statt. Die Manganoxidation im Medium E kann nicht eindeutig mikrobiologischen Prozessen zugeordnet werden, da der pH-Wert bereits nach wenigen Tagen in diesem Medium auf über acht angestiegen ist.

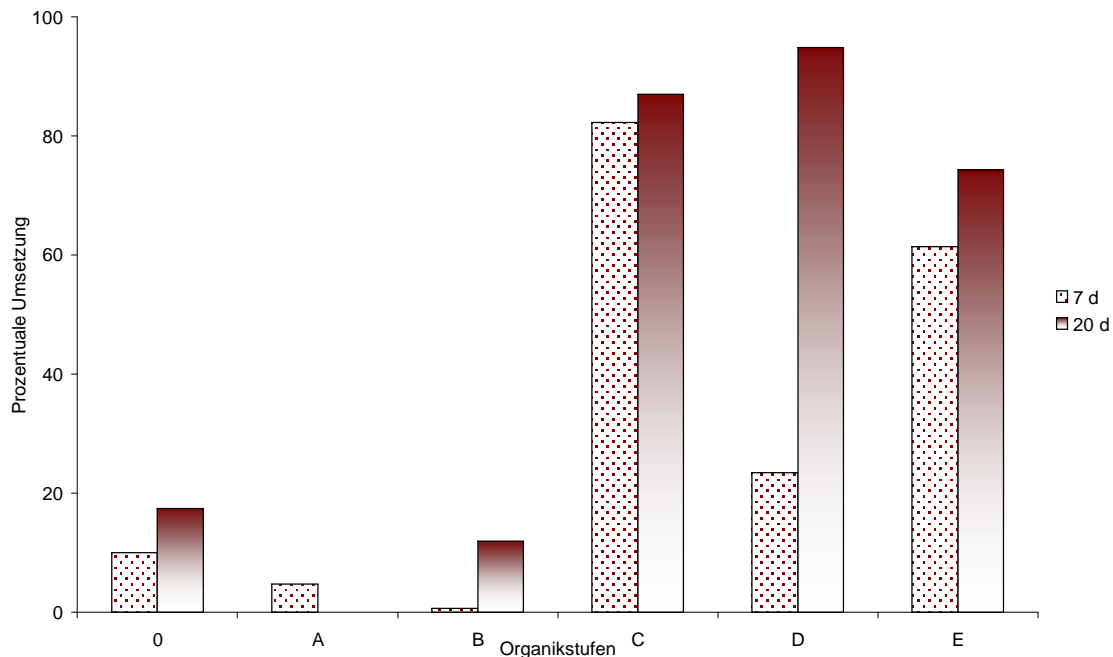


Abb. 62 Prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat L1 nach 7 bzw. 20d. Es ist ein deutliches Optimum bei den Organikstufen C und D erkennbar. Die Manganoxidation in Medium E kann nicht eindeutig der mikrobiologischen Prozessen zugeordnet werden, da der pH-Wert in diesem Medium bereits nach wenigen Tagen auf Werte um bzw. über 8 angestiegen ist

3.9.3.3 Isolat R4 – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

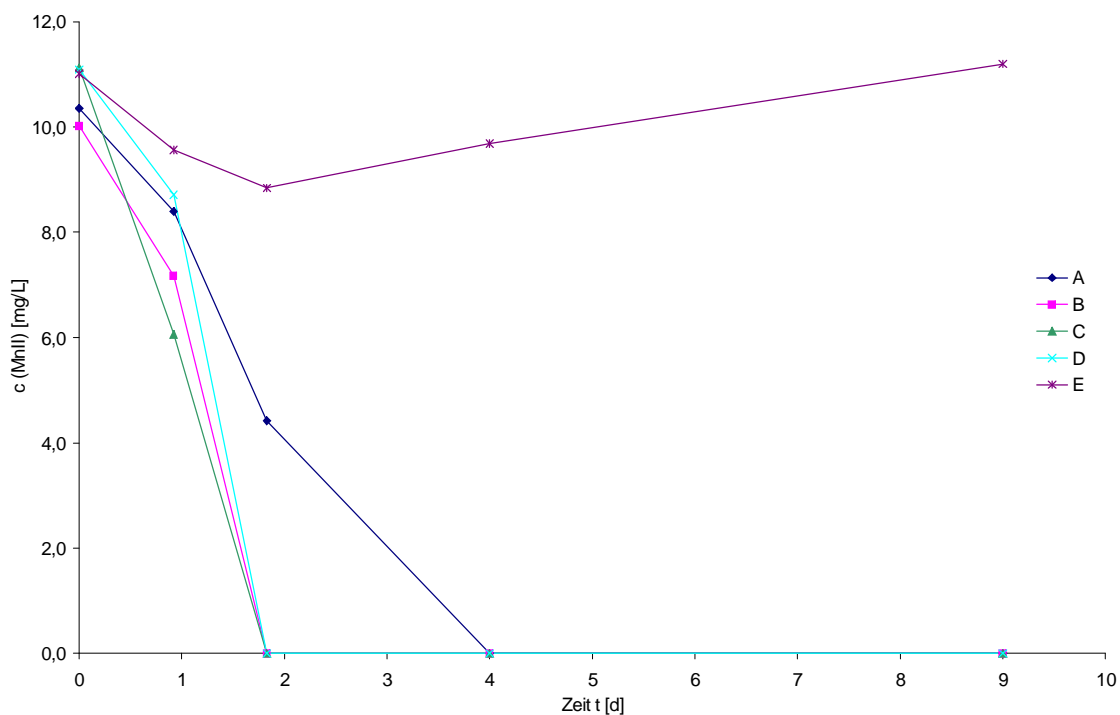


Abb. 63 Isolat R4 - Abhängigkeit der Manganoxidation bei verschiedenen Organikgehalten.

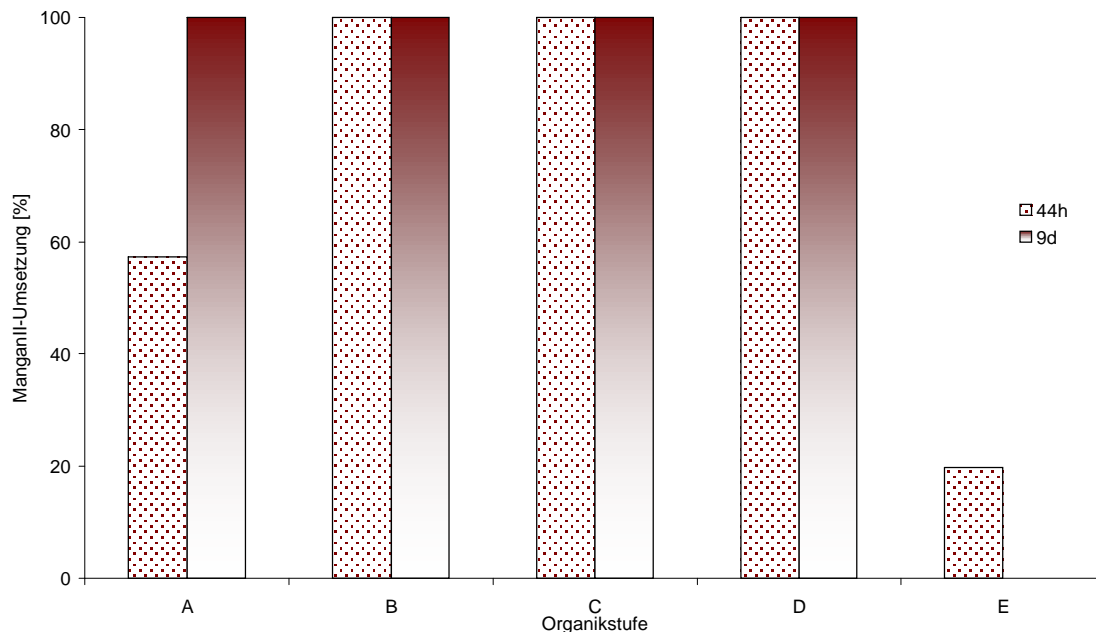


Abb. 64 Prozentuale ManganII-Umsetzung durch Isolat R4 nach 44h bzw. 9d. Es ist ein Optimum bei den Organikstufen B, C und D erkennbar. Bei Stufe E ist die Manganoxidation gehemmt.

Isolat R4 (mögl. *L. lopholea*) zeigt eine deutliche Hemmung der Manganoxidation bei hohen Organikkonzentrationen (ab 2,5g/L). Der ManganII-Gehalt bleibt im Medium E über den Versuchszeitraum stabil (vgl. Abb. 63-64). Aus den Abbildungen 63 und 64 wird erkennbar, dass **das Oxidationsfenster für Isolat R4 deutlich breiter ist, als für die Isolate L1 und Th.** Bereits nach 44h ist aus den Medien B, C und D das ManganII quantitativ entfernt. Im Medium A zeigt sich dieser Effekt nach 96h. Isolat R4 ist für die Manganoxidation also offenbar nicht auf ähnlich große Organikmengen angewiesen, wie die Isolate der Art *L. discophora*, ist aber ähnlich empfindlich größeren Organikkonzentrationen gegenüber.

Da Grundwässer (mit einzelnen Ausnahmen) organikarm sind, könnte die Unabhängigkeit von organischem Material für den Einsatz von *L. lopholea* als Starterkultur für die Entmanganung ein Vorteil sein.

Bei Isolat R4 bleiben die pH-Werte in allen Medien im Versuchszeitraum stabil (ca. 7,1–7,3) (nicht dargestellt) und haben damit keinen Einfluss auf die Manganoxidation.

3.9.3.4 Isolat KIN – Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

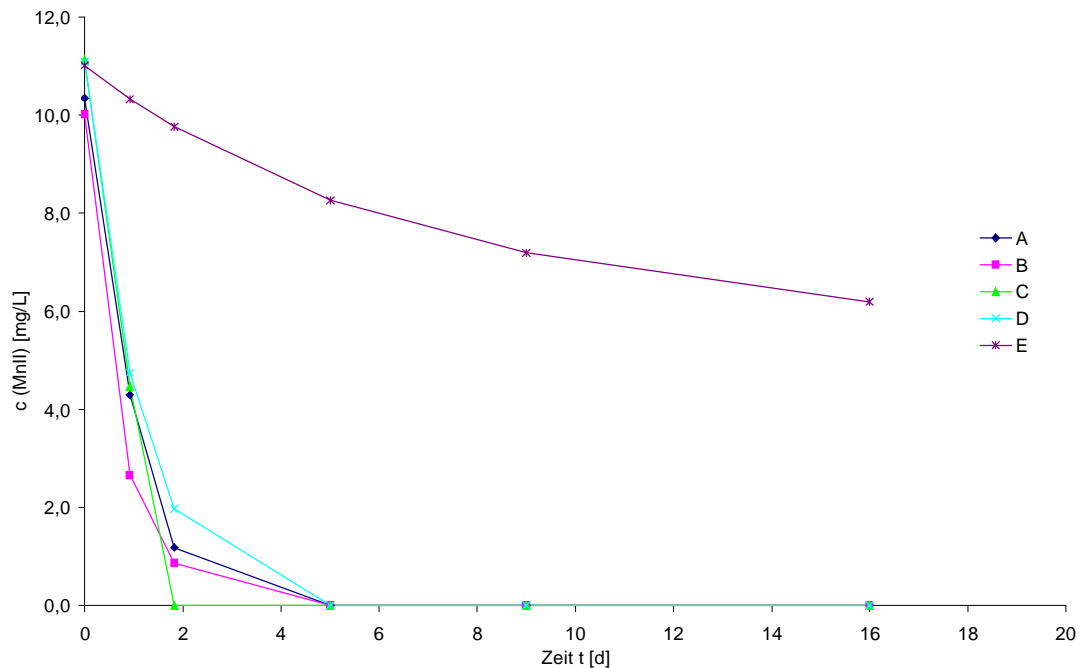


Abb. 65 Isolat KIN – Zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit vom Organikgehalt im Medium. Die Manganoxidation verläuft im Bereich hoher Konzentrationen an organischen Substanzen deutlich verzögert.

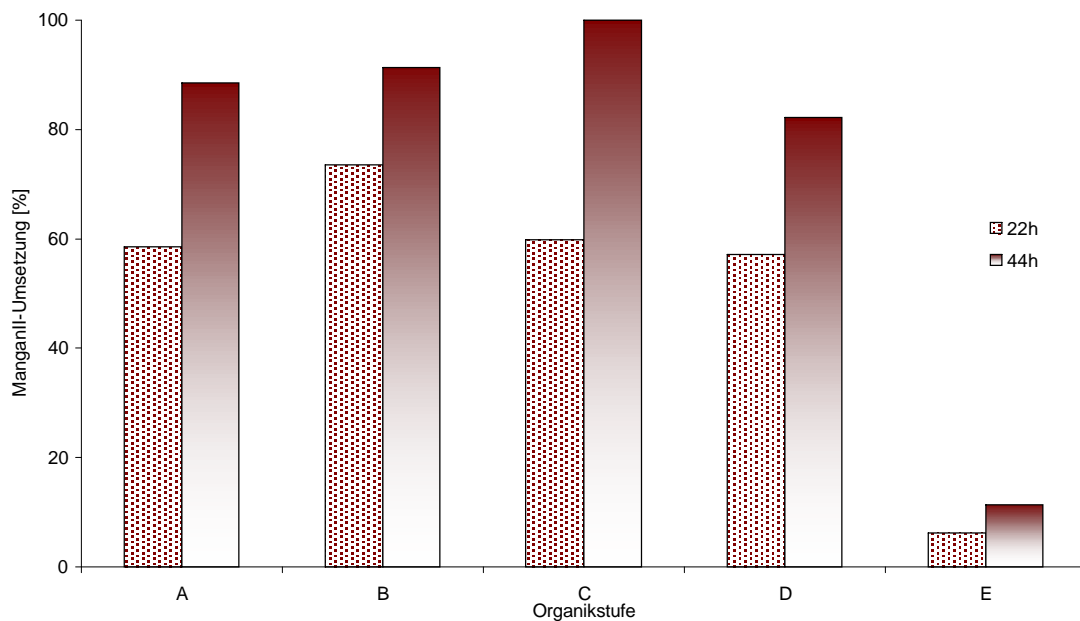


Abb. 66 Isolat KIN – Prozentuale ManganII-oxidation nach 22h und nach 44h. Das Optimum für die Manganoxidation liegt im Bereich des Mediums B (5mg/L).

Eine Verzögerung der Manganoxidation durch starke Organikgehalte ist auch bei Isolat KIN zu erkennen. Für diesen Stamm lässt sich ein Organik-Optimum zwischen 50 und 250mg/L feststellen (vgl. Abb. 65-66). Bei jeweils konstantem pH-Wert (Werte zwischen 7,1 und 7,4 - nicht dargestellt) ist das ManganII nach 44h aus den Medien A, B und D zu je ca. 80%, aus Medium C zu 100% entfernt. Dennoch ist die Manganoxidation auch bei Isolat KIN über einen weiten Bereich der Organikkonzentrationen möglich und atypisch hohe Organikkonzentrationen (über 250mg/L) wären für die technische Umsetzung einer Manganoxidation kein Hindernis. Selbst bei einer Hefeextraktkonzentration von 2500mg/L sinkt der ManganII-Gehalt im Medium in 16d um gut 35%.

3.9.3.5 Isolat D1 - Der Einfluss der Organik auf die Manganoxidation

Isolat D1 zeigt im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen eine andere Charakteristik. Medium E wird auch hier wegen des stark gestiegenen pH-Wertes (7,9–8,4) nicht weiter berücksichtigt. Isolat D1 zeigt im Versuchszeitraum (hier 62Tage) eine starke MnII-Abnahme nur im Medium A (ca. 90%). Die Medien 0, B,

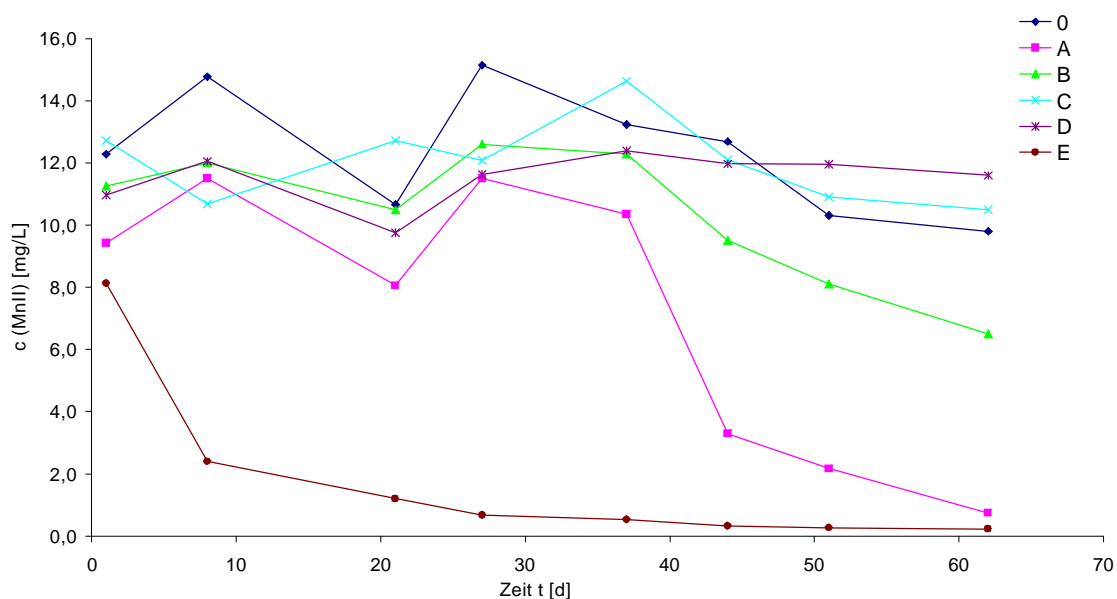


Abb. 67 Isolat D1 - Abhängigkeit der Manganoxidation vom Organikgehalt im Medium

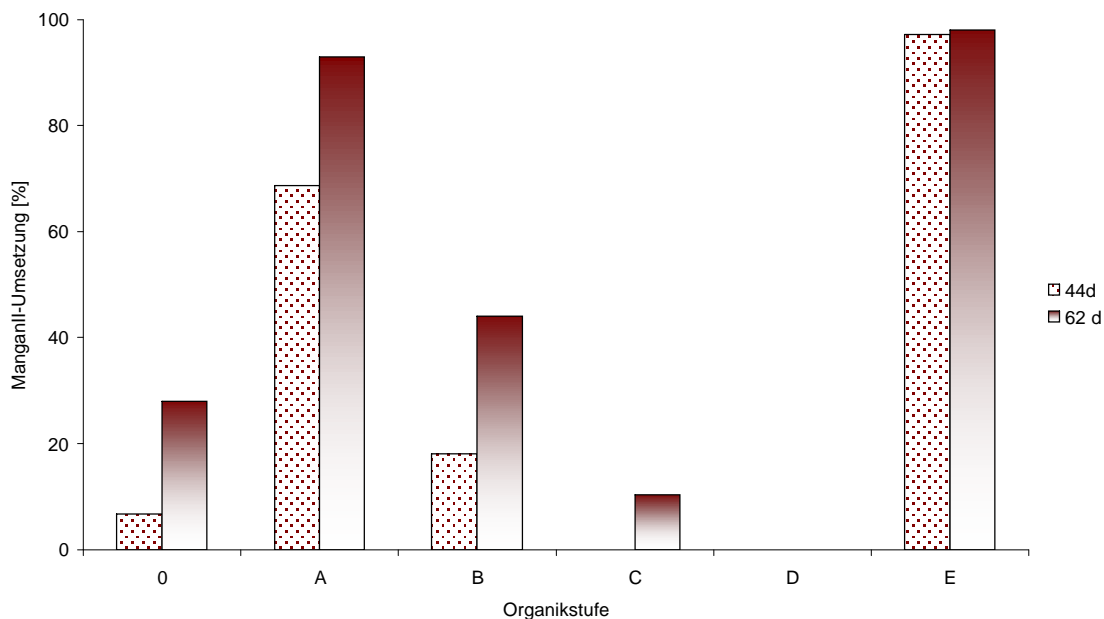


Abb. 68 Prozentuale ManganII-Umsetzung nach 44d und 62d. Ein deutliches Optimum besteht bei Organikstufe A (0,5 mg/L]. Höhere Organikmengen (>50mg/L) hemmen offenbar die Manganoxidation durch Isolat D1. Die hohen Umsetzungsraten bei Stufe E erklären sich aus einem stark angestiegenen pH-Wert (bis 8,4).

und C zeigen eine deutlich schwächere Manganoxidationsaktivität. Im Medium D bleibt die Manganoxidation aus. In diesem Ergebnis zeigt sich die geringe Toleranz des Isolats D1 für nicht-optimale Milieubedingungen.

Die untersuchten Isolate zeigen jeweils spezifische Reaktionen auf die verschiedenen Konzentrationen organischen Materials. **Das kleinste „Oxidationsfenster“ zeigt Isolat D1.** Während bei einer Organikkonzentration von 0,5 mg/L die Manganoxidation im Versuchszeitraum nahezu quantitativ erfolgt, ist sie ohne jede Zugabe von organischem Material erheblich schwächer und bleibt auch bei höheren Konzentrationen (ab 5mg/L) nahezu aus. Dieser enge Oxidationskorridor unterstreicht die Einschätzung, dass Isolat D1 nur unter sehr spezifischen Bedingungen eine Manganoxidation in kurzer Zeit durchführen kann. Ein erfolgreicher Einsatz als Starterkultur mit möglicherweise schwankenden oder nicht-optimalen Umweltbedingungen bleibt daher fraglich.

Die Isolate R4 und KIN zeigen das breiteste Spektrum. Beide zeigen Manganoxidation in kurzer Zeit in allen angebotenen Medien bis zu 250mg/L Hefeextrakt. Die Ergebnisse sind damit vergleichbar mit denen von Schmidt [Schmidt 1979].

Die Isolate L1 und Th liegen in ihrem Organikoptimum bezüglich der Manganoxidation im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 250mg/L. Sie scheinen daher für die Entmanganung organikreicher Wässer, etwa mit sehr hohem Huminsäureanteil geeignet zu sein.

3.9.4 Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation.

Die Salzgehalte in deutschen oder in Deutschland vertriebenen Mineralwässern variieren zum Teil erheblich (<300 bis ca. 2500mg/L). Während noch bis in die 80'ger Jahre hinein Wässer mit Mineraliengehalten von über 1000mg/L üblich und vom Gesetzgeber gefordert wurden, geht der Verbrauchergeschmack in den letzten Jahren immer mehr zu geschmacklich neutraleren und salzärmeren Wässern. Dieser Änderung des Verbrauchergeschmacks ist der Gesetzgeber dadurch begegnet, dass gemäß §2 (1) Nr. 4 der MTV Wässer mit Salzgehalten unter 1000mg/L als Mineralwasser unter bestimmten Voraussetzungen in den Verkehr gebracht werden dürfen. Dennoch sind auch heute noch Wässer mit höheren Mineralstoffgehalten auf dem Markt. Diese Mineralstoffe könnten ein wichtiger Faktor bei der Manganoxidation darstellen. Im Dauerbetrieb könnte ein Mangel an bestimmten Mengenelementen (z.B. Ca, Mg) oder aber auch eine erhöhte Konzentration an diesen Salzen die Fähigkeit der eingesetzten Mikroorganismen, wie auch der jeweiligen brunneneigenen Mikroflora beeinflussen.

Um die Zusammenhänge zwischen der Salinität und der Manganoxidation näher zu untersuchen, wurde zunächst ein Mineraliengemisch, welches in wässriger Lösung so durchaus in handelsüblichen Mineralwässern auftreten könnte, erstellt:

CaCl ₂ :	2,5 mmol/L	=	277 mg/L
MgSO ₄ :	2,6 mmol/L	=	313 mg/L
NaCl:	8,2 mmol/L	=	497 mg/L
K ₂ SO ₄ :	0,5 mmol/L	=	87 mg/L

Diese für Mineralwässer mögliche Zusammensetzung mit einem errechneten Gesamtmineraliengehalt von ca. 1150mg/L wurde als Grundlage genutzt, um verschiedene Salinitäten im flüssigen, gepufferten Basismedium (vgl. 2.8) einzustellen, und den Einfluss auf die Manganoxidationsgeschwindigkeit der verschiedenen Isolate zu untersuchen (vgl. Tab. 9).

	Stufe 0 Ionenkon- zentration* [mg/L]	Stufe 0,1 Ionenkon- zentration* [mg/L]	Stufe 0,3 Ionenkon- zentration* [mg/L]	Stufe 1 Ionenkon- zentration* [mg/L]	Stufe 3 Ionenkon- zentration* [mg/L]
Calcium Ca^{2+}	0	10	30	100	300
Magnesium Mg^{2+}	0	6	19	63	189
Chlorid Cl^-	0	47	140	468	1404
Sulfat SO_4^{2-}	0	30	89	298	894
Natrium Na^+	0	19	57	189	567
Kalium K^+	0	4	12	39	117
Summe	0	116	347	1157	3471

Tab.9

* Zugegebene Mengen durch die Art des Beimpfens oder andere Medienbestandteile bleiben unberücksichtigt.

3.9.4.1 Isolat Th – Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation

Es zeigen sich deutliche Einflüsse der Salinität auf die Manganoxidation. Während Isolat Th bei geringer Salzzugabe bereits nach 2d eine vollständige Entfernung des ManganII aus dem Medium bewirkt, werden quantitative Entfernungen bei höheren Konzentration (Stufe 0,3) oder ohne Salzzusatz erst nach weiteren vier Tagen beobachtet (vgl. Abb. 69-70). **Eine geringe Salzzufuhr ist für die Manganoxidation von *L. discophora* (scheidenbildend) förderlich. Eine zu hohe Salzkonzentration bewirkt hingegen eine Verzögerung der Manganoxidation.** So ist bei Stufe 3 (über 3000ppm) auch bei Versuchsende nach 10Tagen keine quantitative Entfernung des ManganII aus dem Medium zu beobachten.

Die pH-Werte sind offensichtlich in diesem Versuch nicht maßgeblich für die Hemmung der Manganoxidation. Sie bleiben, unbeachtet kleinerer Schwankungen, durchweg im – eingestellten – Bereich des pH-Optimums für die Manganoxidation des Isolats Th bei ca. 6,3 – 6,7 (nicht dargestellt).

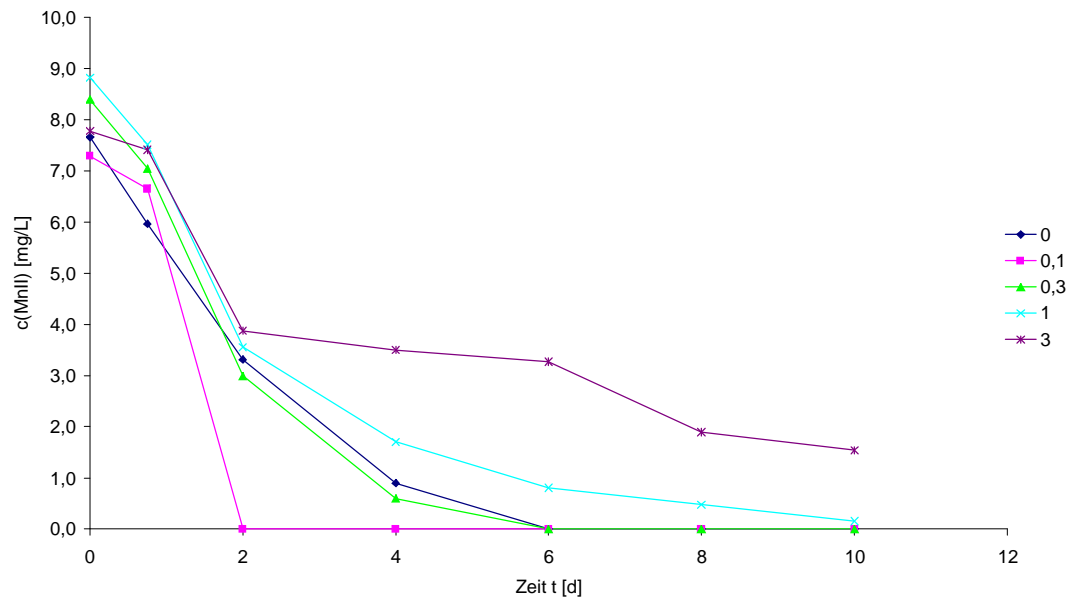


Abb. 69 Isolat Th - Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation bei Isolat Th. Geringe Zugaben der Salzstammlösung (Stufe 0,1: vollständige Umsetzung bereits nach 2d) wirken sich positiv auf die Geschwindigkeit der Manganoxidation aus, während höhere Konzentrationen (Stufen 1 und 3) sich verzögernd auswirken.

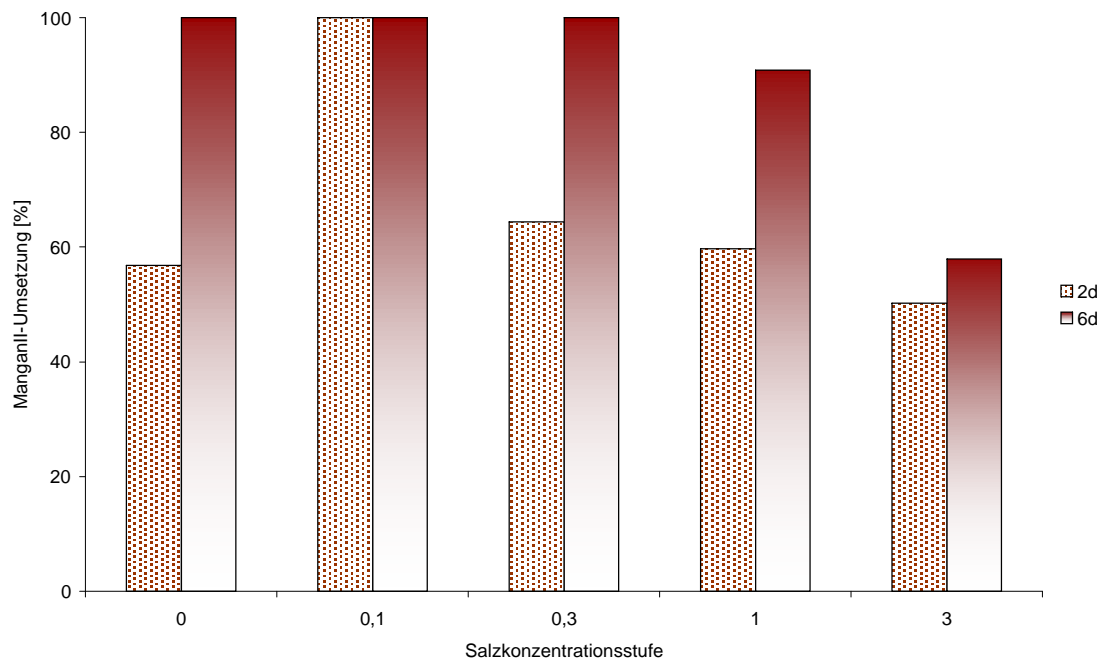


Abb. 70 Isolat Th - prozentuale Umsetzung der MnII-Ionen nach 2 und nach 6d – das Optimum liegt im Bereich der Stufe 0,1 (etwa entsprechend 100ppm);

3.9.4.2 Isolat L1 - Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation

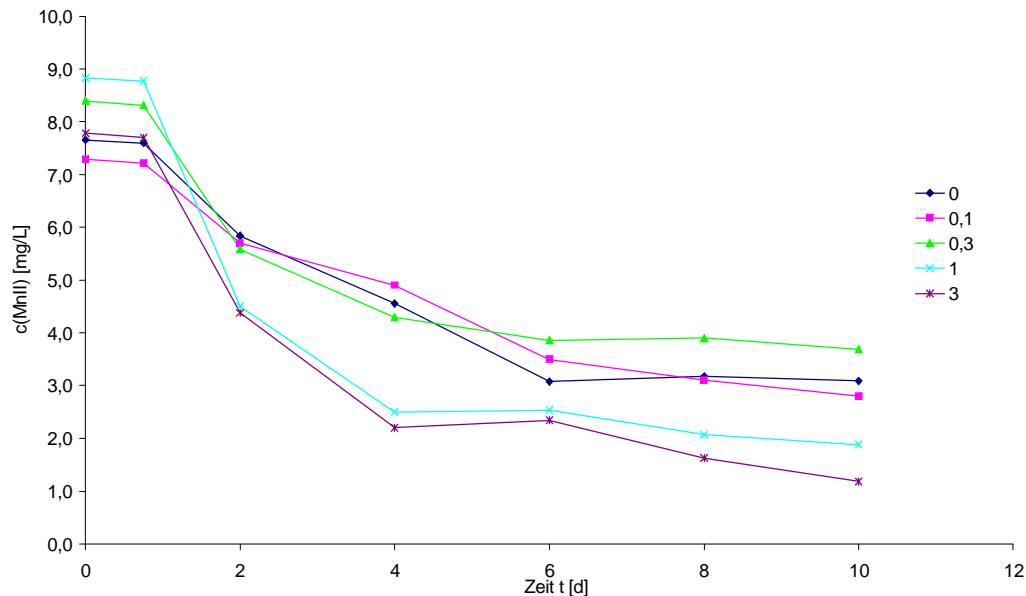


Abb. 71 Isolat L1 - Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation. Höhere Salzkonzentrationen begünstigen offenbar die Manganoxidation.

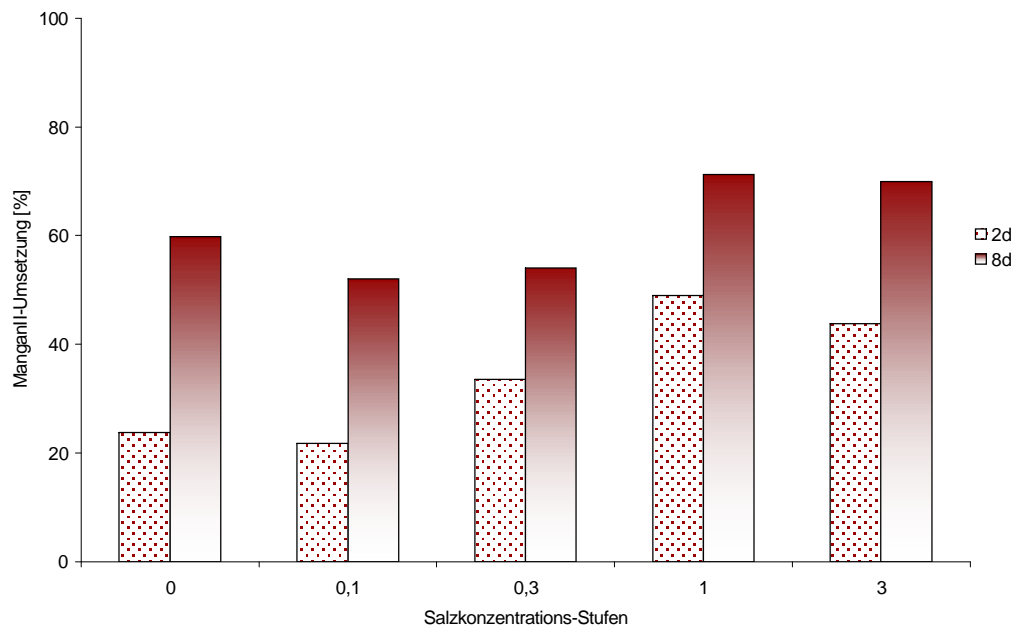


Abb. 72 Isolat L1 - prozentuale Umsetzung der MnII-Ionen nach 2d und nach 8d – das Optimum liegt bei höheren Salzkonzentrationen.

Der Einfluss der Salinität auf die ManganII-Umsetzung ist bei der nichtscheidenbildenden Variante von *L. discophora* deutlich schwächer ausgeprägt, als bei der scheidenbildenden. Der Bereich des Optimums ist darüber hinaus in den Bereich höherer Ionenkonzentrationen verschoben (ca. 1000ppm) (vgl. Abb. 71-72).

Der pH-Wert spielt auch hier nur eine untergeordnete Rolle. Die Werte schwanken im gepufferten Medium nur schwach (ca. 6,4–6,7), so dass ein pH-Einfluss auf die veränderten Manganumsetzungsraten auszuschließen ist (nicht dargestellt). Auch hier kann nur die fehlende Scheidenbildung ursächlich für den fehlenden Effekt der Ionenzugabe auf die Manganoxidation sein, da die scheidenbildende Variante eine deutlich positive Wirkung der Salzzugabe auf die Manganoxidation zeigt. Während zur Bildung von Scheiden also offensichtlich zumindest geringe Mengen an Salzen benötigt werden, **ist der manganoxidierende Prozess über Haftscheiben nicht so stark von den Milieubedingungen abhängig, sie wird allerdings auch nicht durch eine entsprechende Ionenfracht im Wasser stimuliert.**

3.9.4.3 Isolat R4 – Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation

Isolat R4 zeigt keine signifikanten Einflüsse bei der ManganII- Oxidation bezüglich höherer oder erniedrigter Salzkonzentrationen. Bei allen angebotenen Ionenkonzentrationen ist die ManganII-Entfernung aus dem Medium nach 48h quantitativ erfolgt. Nach 24h sind geringe Verzögerungen bei erhöhten Salzkonzentrationen erkennbar (vgl. Abb. 73-74). **Dennoch ist die Manganoxidation durch Isolat R4 auch bezüglich der Ionenkonzentration im Medium eher unempfindlich.**

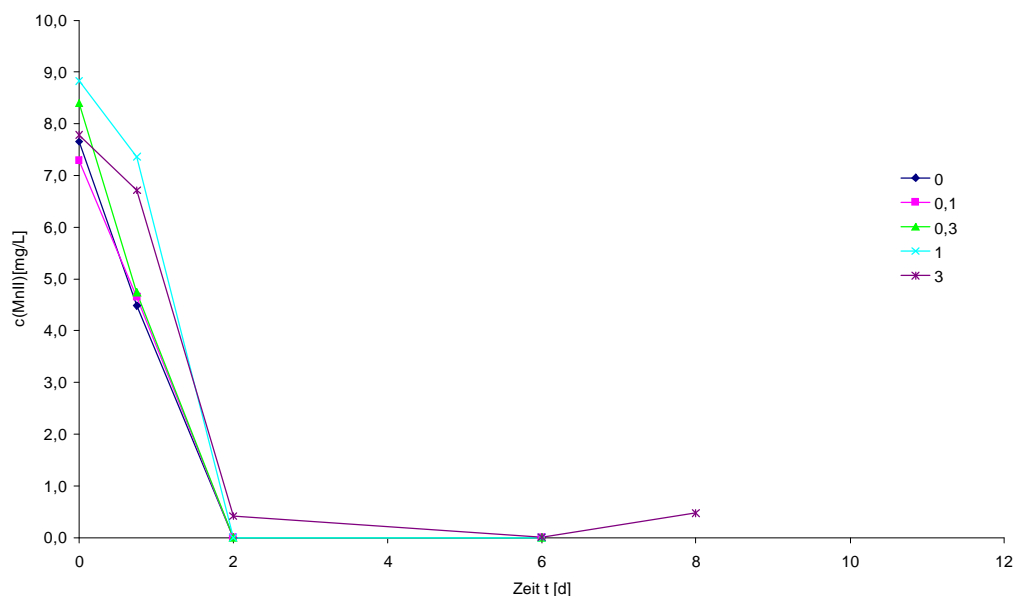


Abb. 73 Isolat R4 – Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation – Im getesteten Bereich hat die Salzkonzentration offenbar keinen Einfluss auf die Manganoxidation.

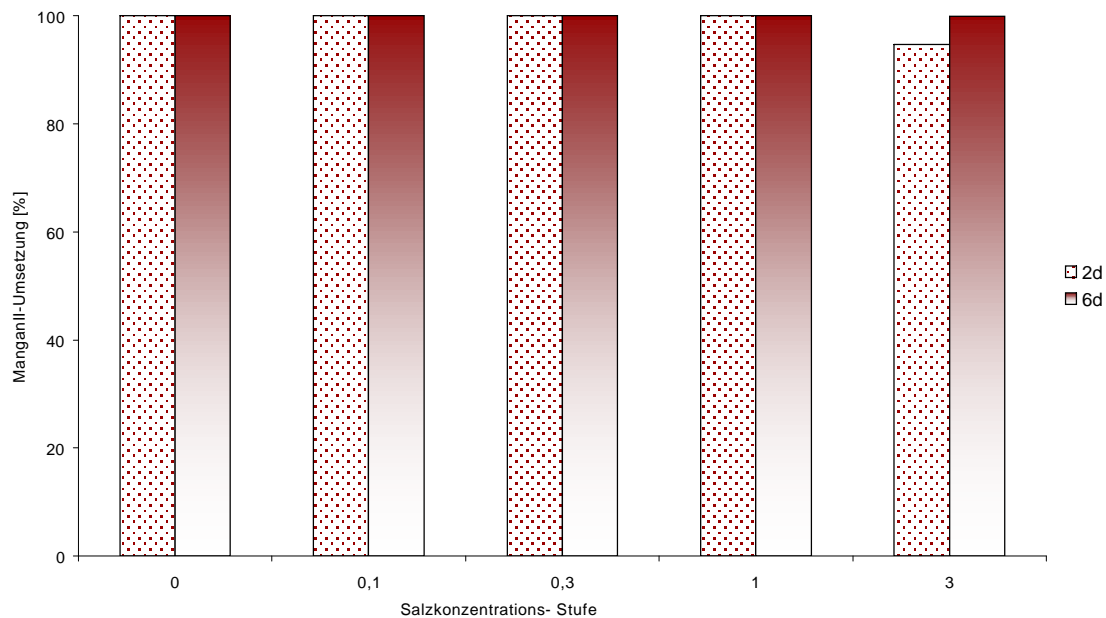


Abb. 74 Isolat R4 - prozentuale Umsetzung des ManganII nach 2d und nach 6d. Die Manganoxidation läuft nahezu unbeeinflusst vom Salzgehalt im Medium ab.

3.9.4.4 Isolat KIN - Der Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation

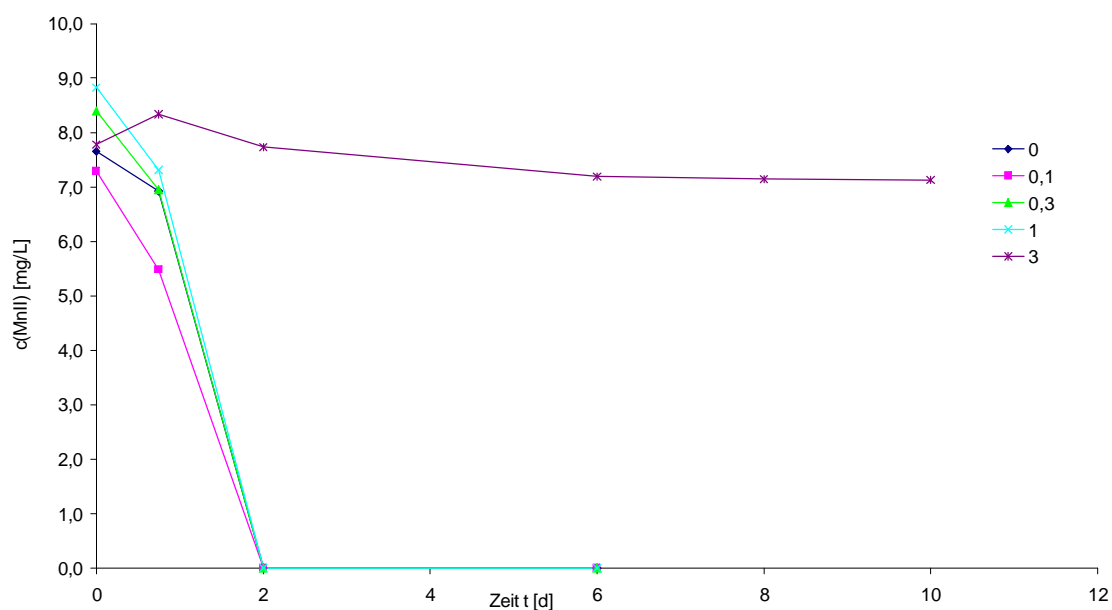


Abb. 75 Isolat KIN - Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation. Deutlich wird die Hemmung der Manganoxidation bei Stufe 3, der höchsten Salzkonzentration.

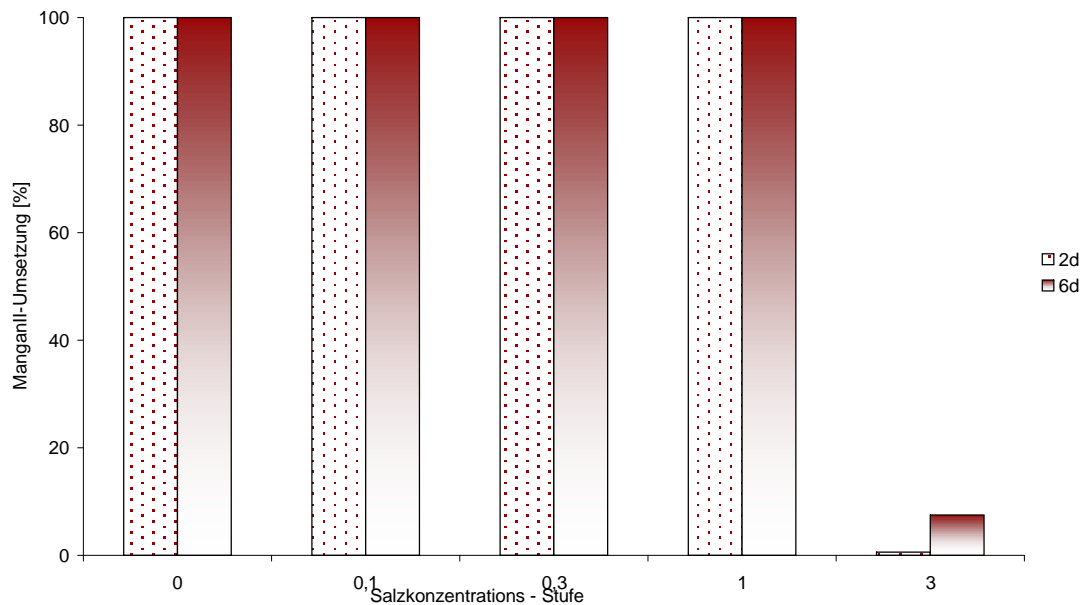


Abb. 76 Isolat KIN – prozentuale Umsetzung der MnII-Ionen nach 2d und 6d. Ein Optimum ist nicht eindeutig erkennbar, jedoch eine deutliche Hemmung bei hoher Salinität (>3000ppm)

Isolat KIN zeigt bei geringeren Salzkonzentration keinen Einfluss auf die Manganoxidation. Bei Stufe 3 (ca. 3000ppm) hingegen tritt eine ganz deutliche Hemmung auf. Eine ManganII-Umsetzung findet im Versuchszeitraum praktisch nicht statt (vgl. Abb. 75-76). Auch hier ist der pH-Wert nicht der auslösende Faktor.

Dies Ergebnis ähnelt den Auswirkungen der Salzkonzentration auf die Manganoxidation durch Isolat R4, jedoch tritt bei Stufe 3 eine fast vollständige Hemmung der Manganoxidation ein. Die Bedingungen der Stufe 3 sind mit über 3000ppm für ein gängiges Mineralwasser sehr hoch, aber denkbar. **Isolat KIN scheint daher eher für Wässer mit schwachen bis mittleren Salzgehalten als Starterkultur geeignet zu sein. Bei stark salzhaltigen Wässern ist mit Problemen zu rechnen.**

Auch bezüglich des Einflusses der Salinität auf die Manganoxidation erscheint Isolat R4 als Starterkultur für die Entmanganung gut geeignet zu sein, da bei allen getesteten Ionenkonzentrationen eine quantitative ManganII-Umsetzung in wenigen Tagen festgestellt werden konnte. Dies spricht nicht nur für eine hohe Toleranz

gegenüber der Gesamt-Salinität, sondern auch gegenüber den einzelnen Ionen, die für die Einstellung der Salinitäten genutzt wurden. Ebenfalls einen geringen Einfluss der Salinität auf die Manganoxidation zeigt Isolat L1, auch wenn hier die Manganoxidation nicht vollständig abläuft. Ähnliches gilt für Isolat Th, das bei geringeren Salinitäten sogar noch besser arbeitet, als bei Stufe 3 mit über 3000ppm. Isolat KIN fällt hingegen bei dieser Konzentrationsstufe vollständig ab. Die Manganoxidation wird deutlich gehemmt.

Isolat D1 fällt aus den Betrachtungen heraus, da die Manganoxidation im Versuchszeitraum ausbleibt. Das flüssige, gepufferte Basismedium bietet offenbar keine entsprechenden Milieubedingungen für eine stabile Manganoxidation.

3.9.5 Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Mineralwässer werden oft aus großen Tiefen gefördert. Die Gesteinsschichten, aus denen sie gewonnen werden, geben dabei nicht nur Mengenelemente, sondern auch Spurenelemente an die (in der Regel sauren) Wässer ab. Der Zusammenhang zwischen der Manganoxidation und Kupferionen wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben und wird noch gesondert zu untersuchen sein (vgl. 3.9.6).

Da verschiedenste Schwermetalle eine strukturelle Rolle in diversen Enzymen spielen [MADIGAN ET AL. 2001], liegt die Vermutung nahe, dass man die manganoxidierenden Prozesse, von denen bereits einige als enzymatische Prozesse erkannt sind [EHRlich 2000] durch gezielte Zugabe von Spurenelementen stimulieren kann. Sollte dies der Fall sein, könnte die natürlich-biologische Manganoxidation in Wässern mit geringem natürlichen Spurenelementanteil oder einem erhöhten Anteil komplexbildender Substanzen (etwa Huminstoffe) ungünstige Voraussetzungen haben.

Das flüssige, gepufferte Basismedium wurde mit verschiedenen Volumina einer definierten Spurenelementlösung (mod. nach Pfennig [BAST 1999]) versetzt, so dass die in Tabelle 12 aufgeführten Konzentrationen für die Untersuchung der Abhängigkeit genutzt werden konnten:

	Zugegeben als	Stammlösung	10µl	100µl	1000µl	10000µl
EDTA	Na-EDTA	5,2 g/L	0,15µmol/L	1,5µmol/L	15µmol/L	150µmol/L
Zn	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	150 mg/L	0,005µmol/L	0,05µmol/L	0,5µmol/L	5µmol/L
B	H ₃ BO ₃	62mg/L	0,01µmol/L	0,1µmol/L	1µmol/L	10µmol/L
Co	CoCl ₂ · 6H ₂ O	190mg/L	0,008µmol/L	0,08µmol/L	0,8µmol/L	8µmol/L

Cu	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17mg/L	0,001 $\mu\text{mol/L}$	0,01 $\mu\text{mol/L}$	0,1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$
Ni	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	24mg/L	0,001 $\mu\text{mol/L}$	0,01 $\mu\text{mol/L}$	0,1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$
Mo	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36mg/L	0,0015 $\mu\text{mol/L}$	0,015 $\mu\text{mol/L}$	0,15 $\mu\text{mol/L}$	1,5 $\mu\text{mol/L}$

Tab. 12

EisenII-Salze werden nicht zugegeben, um autokatalytische Reaktionen an entstandenem FeIII-Oxiden auszuschließen.

Alle eingesetzten Konzentrationen liegen unter bestehenden Grenz- oder Richtwerten für Trink- und Mineralwässer. Wässer mit den hier genutzten Konzentrationen wären also voll verkehrsfähig (!).

3.9.5.1 Isolat Th - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Isolat Th zeigt in den ersten 24h nach Zuimpfen der Zellen einen deutlichen Effekt auf die Fähigkeit zur Manganoxidation (vgl. Abb. 77-79). Ohne Zugabe von Spurenelementen sind nach 24 bzw. 48h 22 bzw. 76% des ManganII zu ManganIV umgesetzt. Bereits durch Zugabe von 10 μL der Spurenelementlösung steigen diese Werte auf 26 bzw. 100% an (100 μL : 32%/100%).

Es zeigt sich aber auch, dass es **bei übermäßiger Spurenelementgabe zu einer**

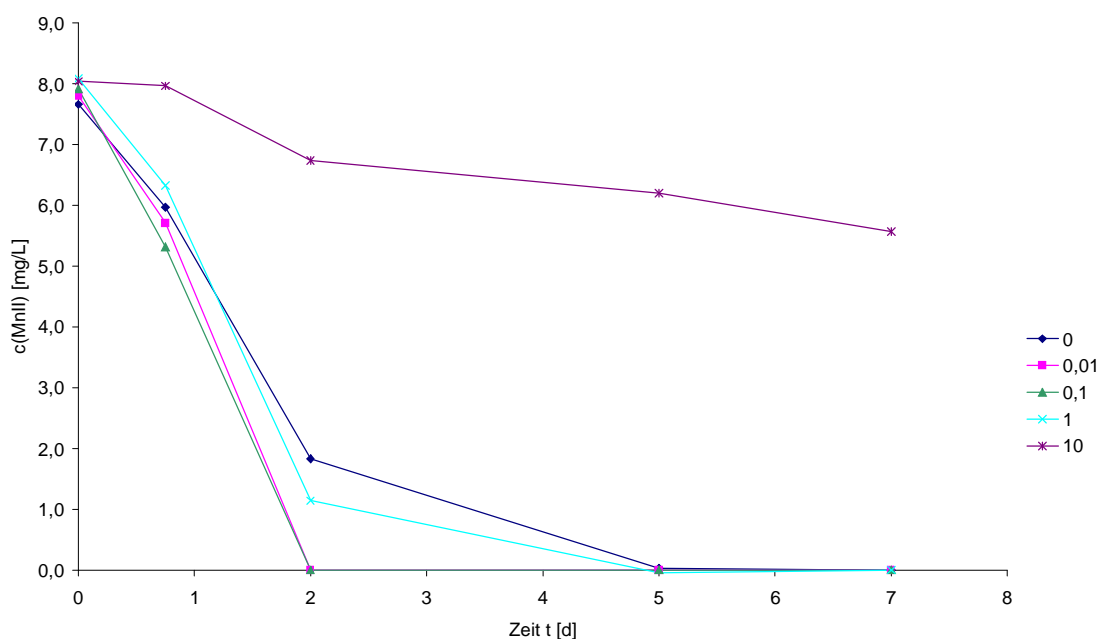


Abb. 77 Isolat Th - Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat Th durch Nichtzugabe von Spurenelementen, aber auch eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Spurenelementen (10mL).

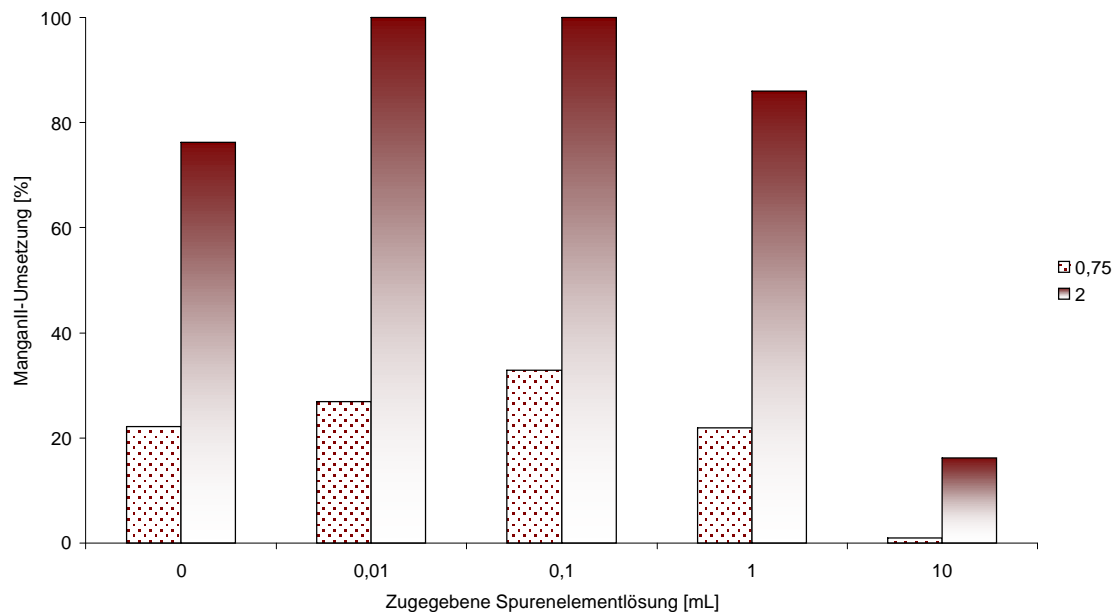


Abb. 78 Isolat Th - Prozentuale ManganII-Umsetzung nach 21h und nach 48h. Optimum der Manganoxidation bei Isolat Th Zugabe von Spurenelementen von 0,01 bzw. 0,1 mL, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (10mL)

Hemmung der Manganoxidationsfähigkeit kommt. Bei Zugabe von 1mL der Lösung werden nach 24 und 48h nur noch 21/85% und bei 10mL 1 bzw. 16% (!) umgesetzt. Aus der Bilderfolge (Abb.80-83) wird ersichtlich, dass bei 10 mL Spurenelementlösung die Scheidenbildung bei Isolat Th ganz deutlich gehemmt ist. Im Präparat sind **keine Scheiden** mehr zu erkennen, während bei geringeren Zugaben die Scheidenbildung und die folgende Verockerung deutlich erkennbar sind.

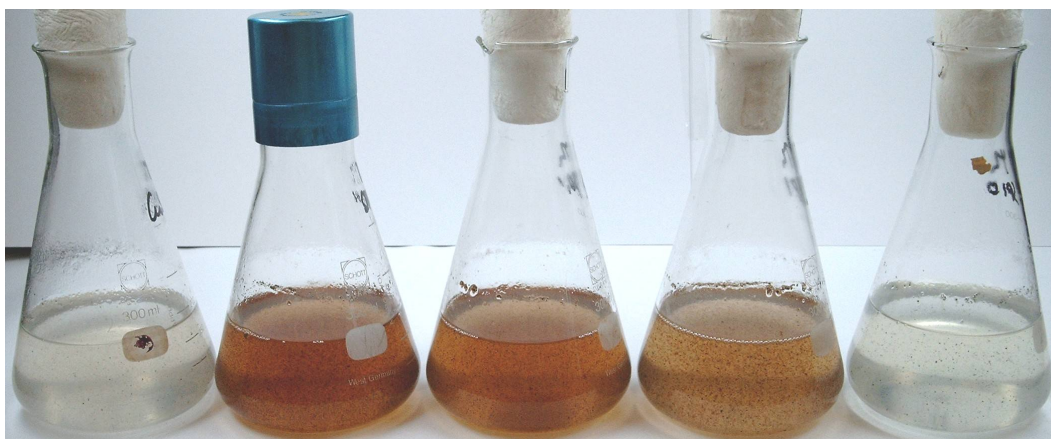


Abb. 79 Batch-Ansätze Isolat Th nach 48h Inkubation. Es wird deutlich, dass bereits geringe Zugaben von Spurenelementen die Manganoxidation beschleunigen können. Bei überhöhter Dosierung tritt hingegen eine Hemmung der Manganoxidation ein.

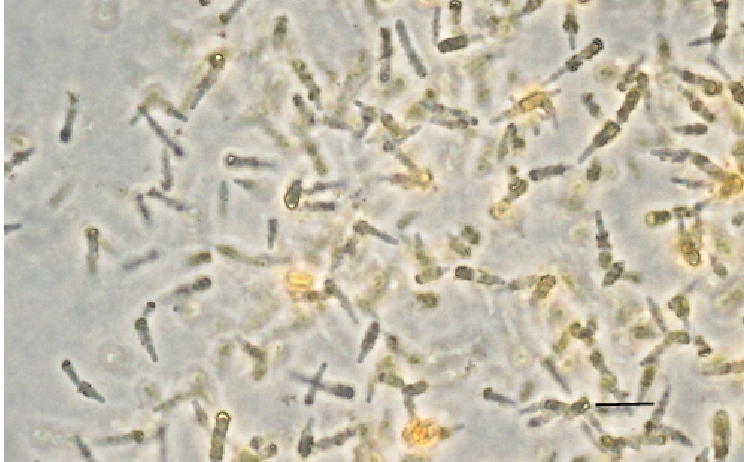


Abb. 80 lichtmikroskopische Aufnahme der Mikroflora in den Batch-Kulturen nach 48h Inkubation ohne Spurenelementzugabe (Balken= 10µm)

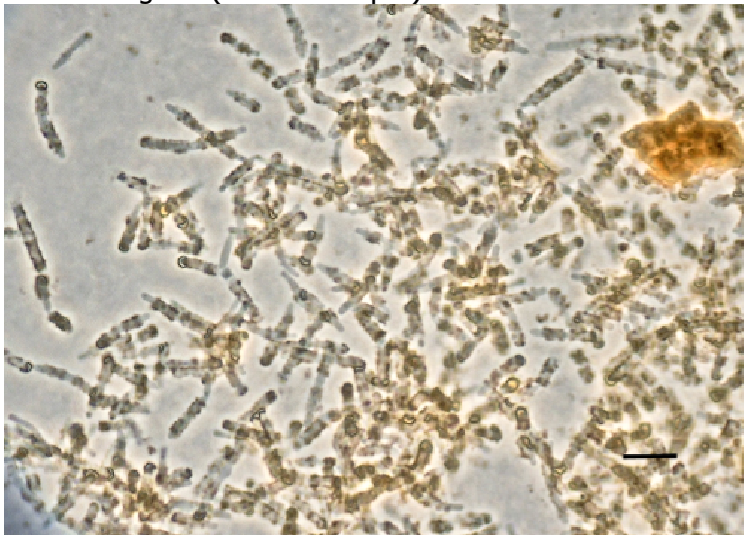


Abb. 81 lichtmikroskopische Aufnahme der Mikroflora in der Batch-Kultur nach 48h Inkubation und 10µL Zugabe der Spurenelementlösung (Balken= 10µm)



Abb. 82 lichtmikroskopische Aufnahme der Mikroflora in der Batch-Kultur nach 48h Inkubation und 1000 μ L Zugabe der Spurenelementlösung (Balken= 10 μ m)

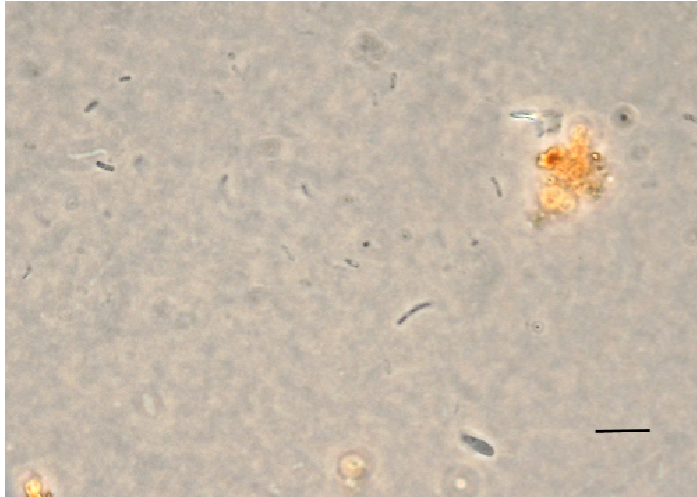


Abb. 83 lichtmikroskopische Aufnahme der Mikroflora in der Batch-Kultur nach 48h Inkubation und 10mL Zugabe der Spurenelementlösung. Deutlich zu erkennen ist die Hemmung der Scheidenbildung (Balken= 10 μ m)

3.9.5.2 Isolat L1 - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Auch hier zeigen sich signifikante Einflüsse der Spurenelementlösungen. Während die Probe ohne Zusatz nach 21 und 48h lediglich 5% bzw. 39% Umsatzrate zeigt, sind diese Umsatzraten bei 10 μ L Zugabe bereits auf 92/100% und bei Zugabe von 100 μ L auf 100/100% angestiegen. Bei Zugabe (1000 μ L) sinken die Werte wieder auf 67/100 ab (vgl. Abb. 84-85). Bei 10mL der Spurenelementlösung sind in diesem Zeitraum noch keine Umsetzungen nachweisbar. Auch hier tritt **durch übermäßige Spurenelementzugabe eine Hemmung der Manganoxidationsfähigkeit** des Isolats L1 ein. Die Ursache hierfür ist derjenigen des Stammes Th vergleichbar. Die Haftscheiben, die beim Stamm L1 zur Manganoxidation führen, bzw. die Orte der Manganoxidation sind, werden nicht gebildet (vgl. Abb. 87-89). Ein Einfluss des pH-Werts ist auch hier zu vernachlässigen (Daten nicht angezeigt).

Offenbar ist die Bildung der Manganoxide über die Haftscheiben stärker von Spurenelementen abhängig, als die Manganoxidation über das Scheidenmaterial, da

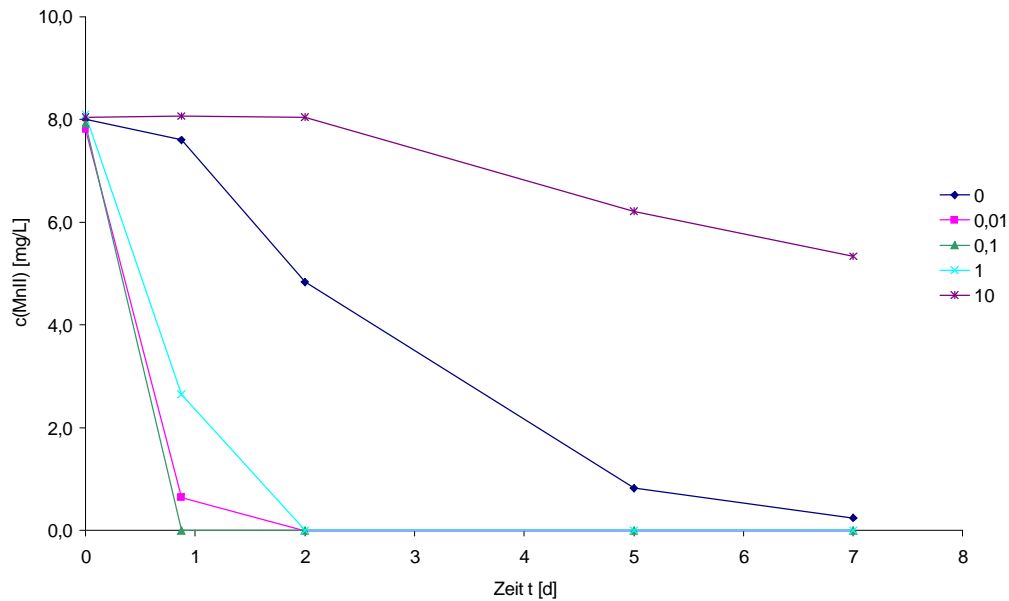


Abb. 84 Isolat L1 - Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation im zeitlichen Verlauf. Deutliche Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat L1 durch Nichtzugabe von Spurenelementen und ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Spurenelementen (>10mL);

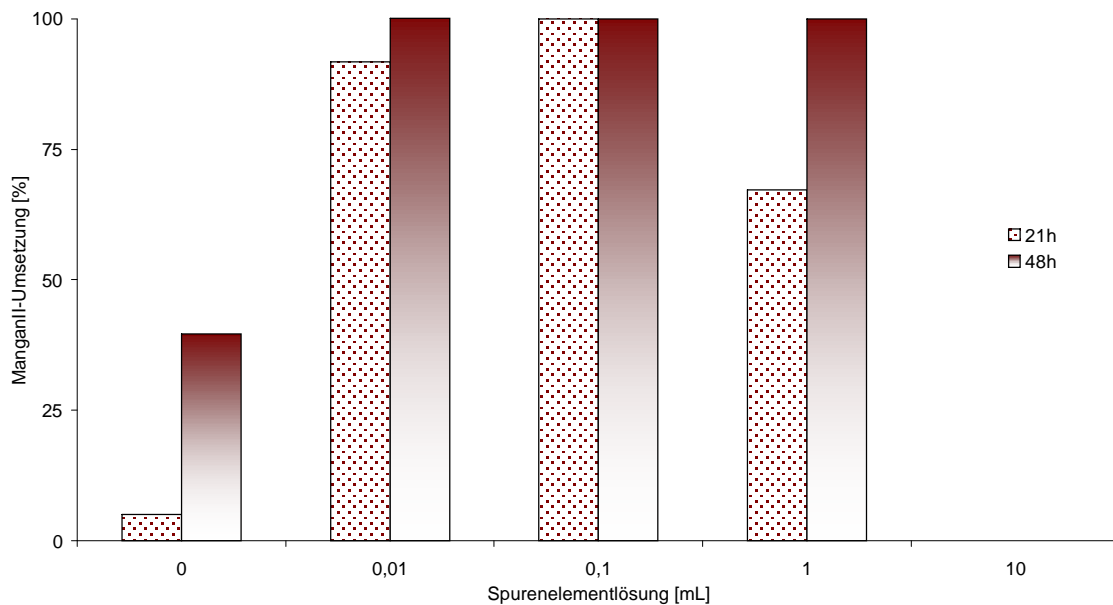


Abb. 85 Isolat L1 - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 21h und nach 48h. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Isolat L1 durch Zugabe von Spurenelementen von 0,01 bzw. 0,1 mL, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (10mL)

die Effekte schon bei geringen Spurenelementzugaben deutlich ausgeprägter sind, als bei Isolat Th.



Abb. 86 Batch-Ansätze Isolat L1 nach 24h Inkubation – Hemmung der Manganoxidation bei hohen Spurenelementzugaben.

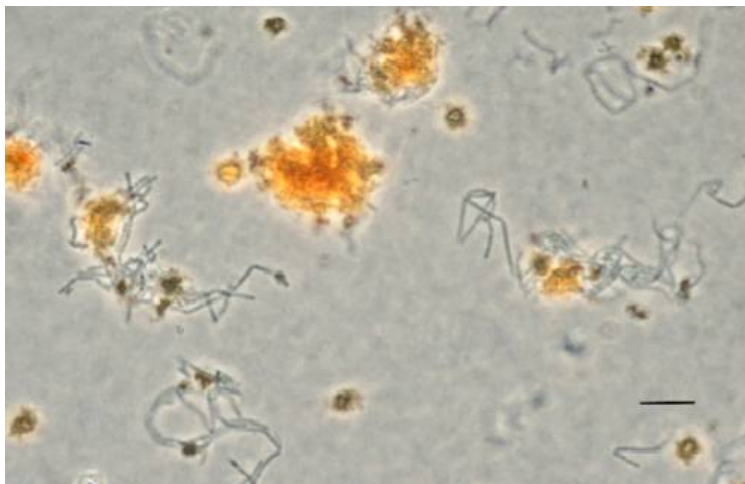


Abb. 87 Isolat L1 mit deutlichen Manganoxidverkrustungen an den Haftscheiben nach Zugabe von 100µl Spurenelementlösung

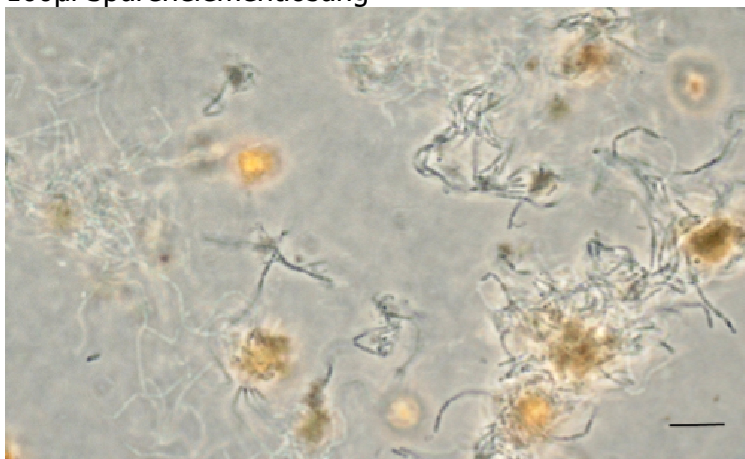


Abb. 88 Isolat L1 mit deutlichen Manganoxidverkrustungen an den Haftscheiben nach Zugabe von 1000µl Spurenelementlösung

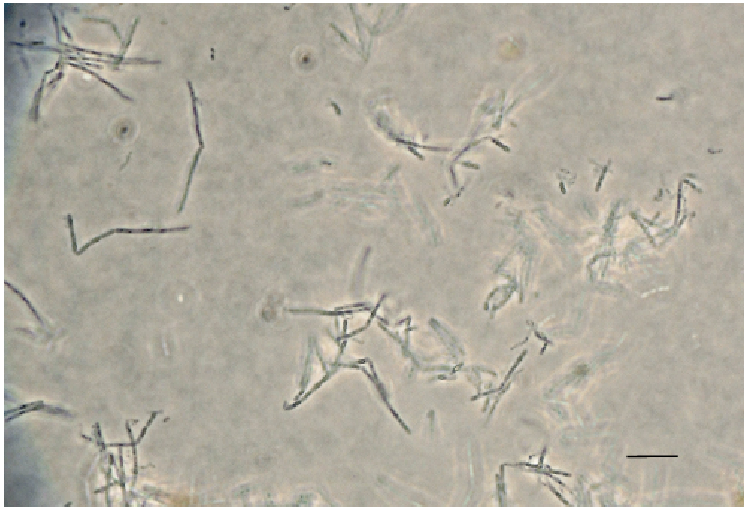


Abb. 89 Isolat L1 ohne Haftscheibenbildung und Manganoxidation nach Zugabe von 10 mL Lösung.

3.9.5.3 Isolat R4 - Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Isolat R4 ist offensichtlich in seiner Fähigkeit zur Manganoxidation nicht im gleichen Maße von der Gabe von Spurenelementen abhängig, wie die Isolate L1 und Th. Auch hier wird zunächst die Manganoxidation durch die Zugabe von kleinen Mengen Spurenelementlösung gefördert. Nach 2d sind jedoch alle Ansätze (auch mit 10mL Spurenelementlösung/L (!)) quantitativ vom ManganII befreit (vgl. Abb. 90-92).

Ohne Spurenelementzugabe ist dies erst später der Fall (gemessen nach 7d). **Auch unter dem Gesichtspunkt der Spurenelementkonzentration erscheint Isolat R4 als Starterkultur sehr gut geeignet zu sein, da auch eine stark erhöhte Spurenelementfracht im Wasser offenbar nur einen geringen Einfluss auf die Manganoxidation durch Isolat R4 hat.**

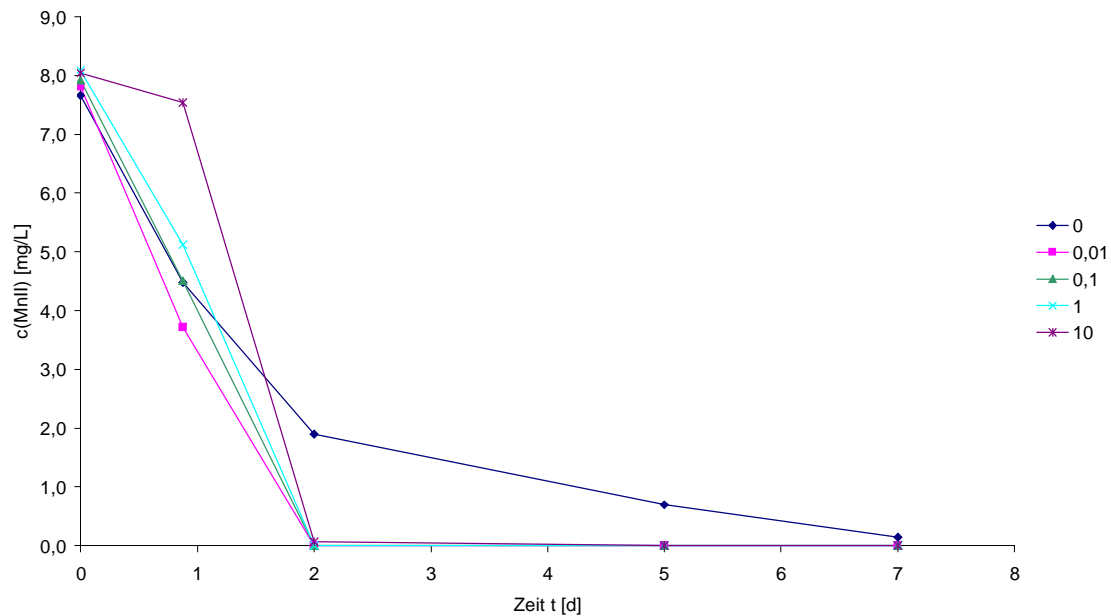


Abb. 90 Isolat R4 - Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation. Keine ausgeprägte Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat R4 durch Nichtzugabe von Spurenelementen, aber auch keine Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Spurenelementen (10mL).

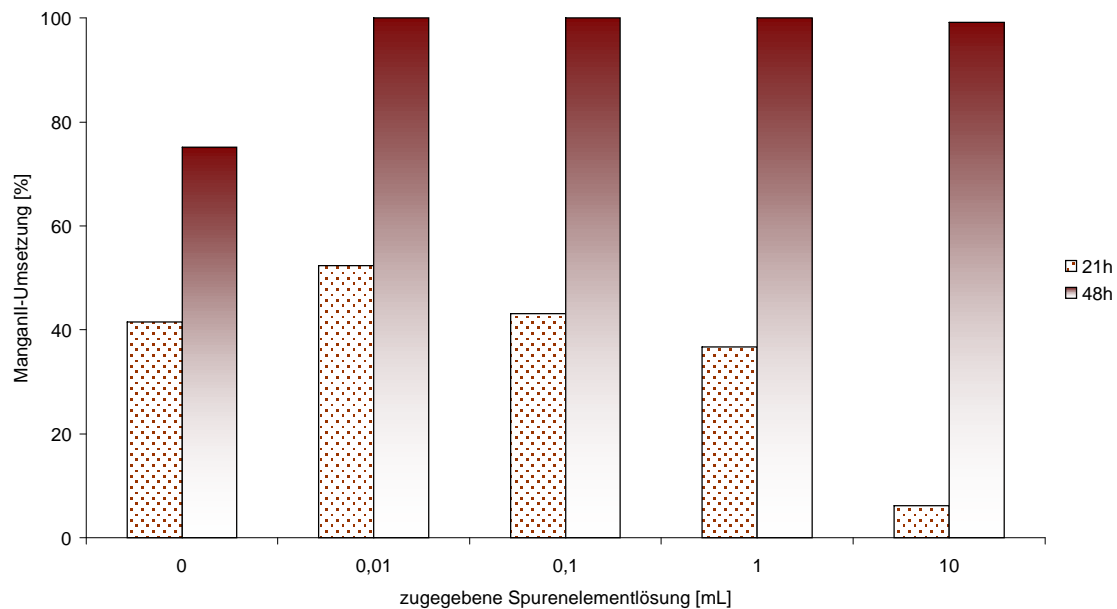


Abb. 91 Isolat R4 - Optimum der Manganoxidation bei Isolat R4 Zugabe von Spurenelementen von 0,01 bzw. 0,1 mL, aber auch leichte Verzögerung der Mn-Oxidation bei höheren Zugaben (>1mL);



Abb. 92 Isolat R4 - Batch-Ansätze nach 48h. Die Konzentration der Spurenelemente ist offenbar kein primärer Einflussfaktor bezüglich der Manganoxidation.

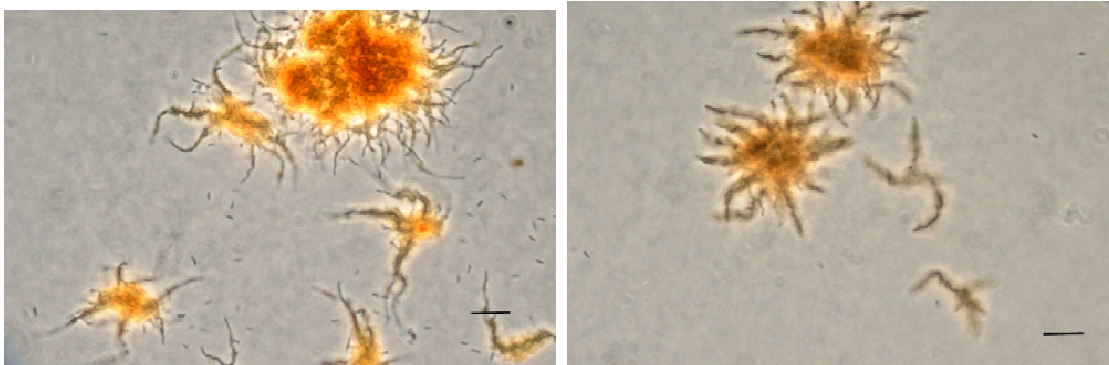


Abb. 93 (links) und 94 (rechts): Sowohl bei Zugabe von 0,01 mL (links), als auch bei Zugabe von 10mL Lösung (rechts) zeigen sich die für Isolat R4 charakteristischen sternförmigen verkrusteten Strukturen.

3.9.5.4 Isolat KIN – Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Auch bei Isolat KIN liegt das Optimum der Spurenelementzugabe im Bereich von 10µl-100µl. Die Hemmung, die sich bereits bei Zugabe von 1000µL Spurenelementlösung andeutet, wird bei 10 mL ganz deutlich. Hier zeigt sich auch nach 8d keine Umsetzung von MnII zu MnIV (vgl. Abb. 95-96). Die Entwicklung lässt sich mikroskopisch nachvollziehen. Bei Zugabe von 10mL findet Kapselbildung, bzw. die Bildung amorpher Strukturen nicht mehr statt (vgl. Abb. 97-99). Die Manganoxidation ist also ganz offensichtlich an die Kapselbildung gebunden.

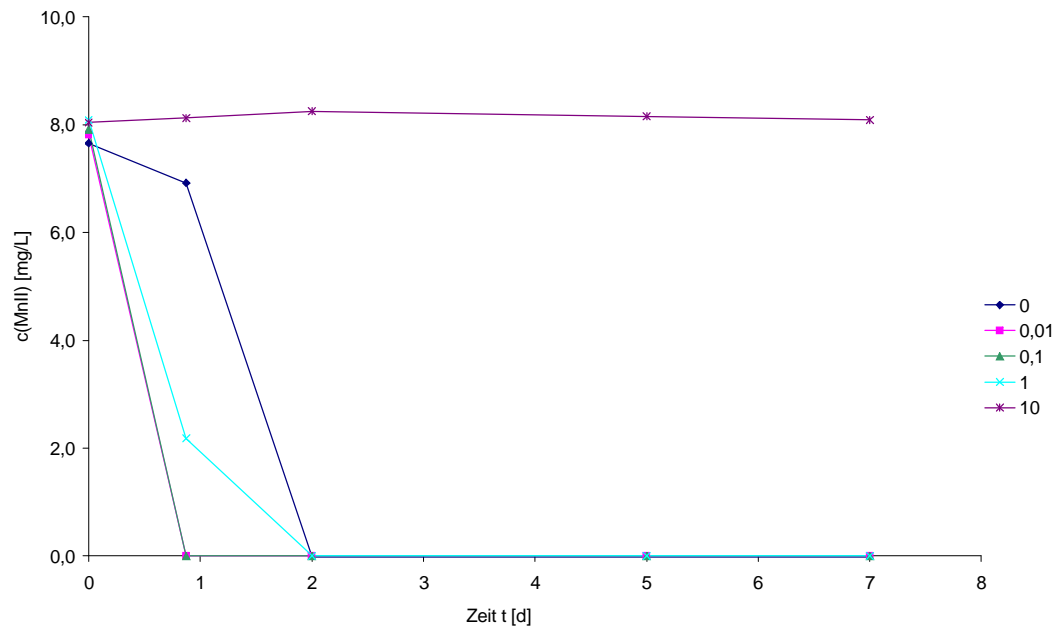


Abb. 95 Isolat KIN - Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation. Eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Spurenelementen (10mL)

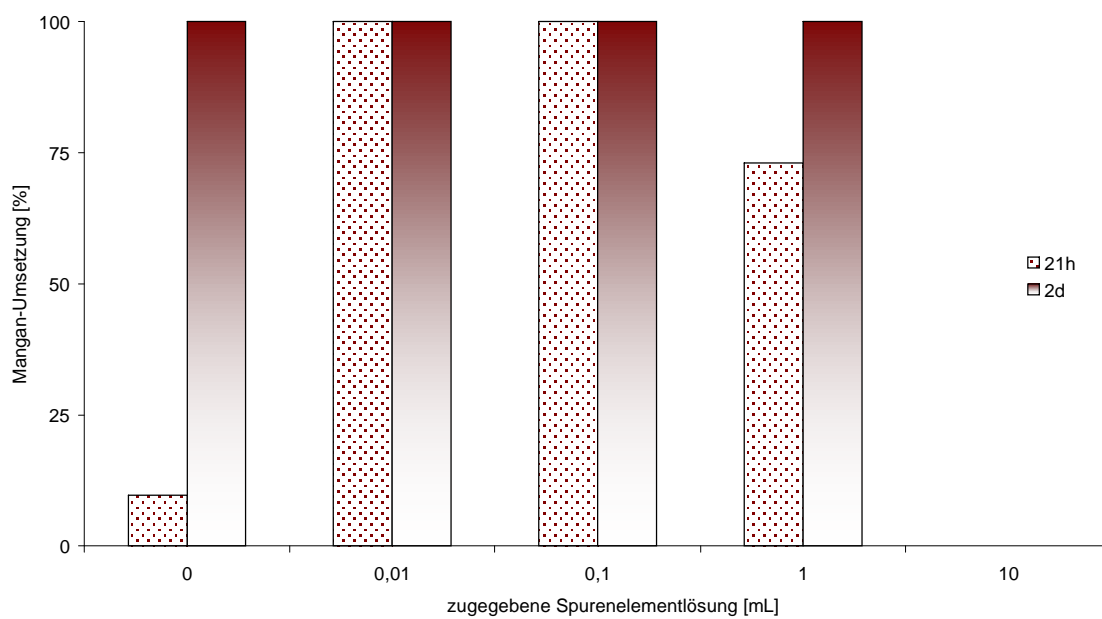


Abb. 96 Isolat KIN - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 21h und nach 2d. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Isolat KIN Zugabe von Spurenelementen von 0,01 bzw. 0,1 mL, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (10mL)

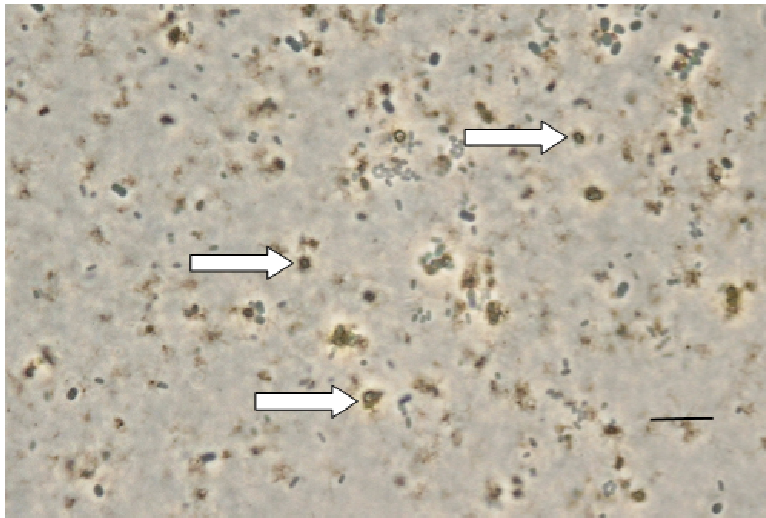


Abb. 97 Isolat KIN - amorphe Strukturen und Kapselbildung
Nach Zugabe von 100µl Spurenelementlösung nach 48h Inkubation (Balken = 10µm)

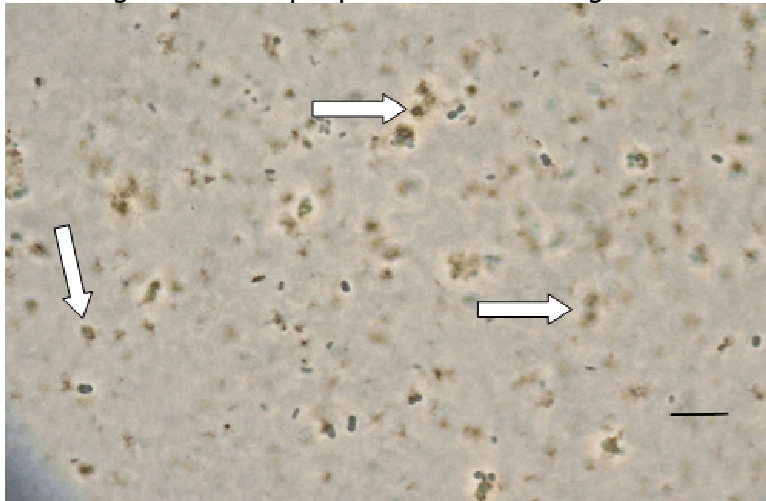


Abb. 98 Isolat KIN - amorphe Strukturen und Kapselbildung
Nach Zugabe von 1000µl Spurenelementlösung nach 48h
Inkubation (Balken = 10µm)

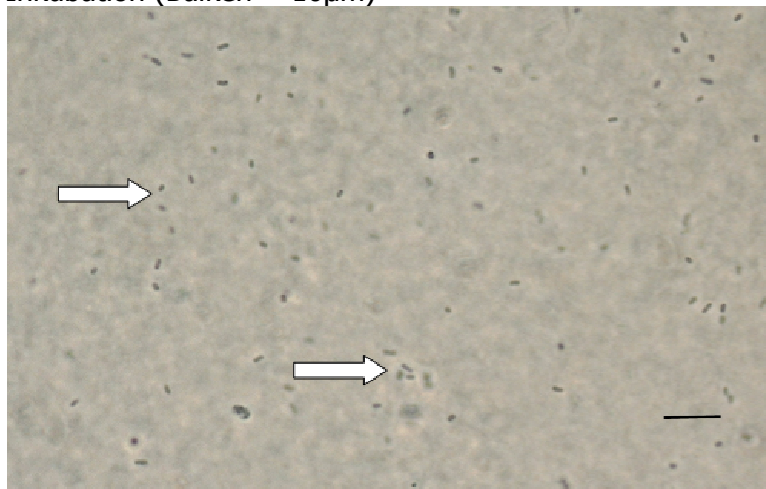


Abb. 99 Isolat KIN - freie Zellen ohne amorphe Strukturen
und Kapselbildung Nach Zugabe von 10mL Spurenelement-
lösung nach 48h Inkubation (Balken = 10µm)

3.9.5.5 Isolat D1 – Der Einfluss von Spurenelementen auf die Manganoxidation

Das Isolat D1 zeigt eine Manganoxidation erneut erst nach mehreren Wochen. Nach 60d sind im Medium mit 100µl Spurenelementzugabe 100% des zugegebenen ManganII eliminiert. Bei 10µl Zugabe sind es ca. 60%, und ohne Zugabe ca. 30%. Bei 1mL und 10mL Zugabe der Spurenelementlösung ist die Manganoxidation zu diesem Zeitpunkt noch unbedeutend, sie ist aber durch den Benzidin-Test bereits nachweisbar (vgl. Abb. 100a). Trotz einer Optimierung der Milieubedingungen durch eine mäßige Spurenelementzugabe bleibt die Manganoxidationsgeschwindigkeit von Isolat D1 mit ca. 60d bis zu einer nennenswerten Manganoxidation noch weit hinter den Geschwindigkeiten zurück, die die anderen untersuchten Isolate bieten. Ein technischer Nutzen des Isolats D1 als Starterkultur bleibt daher weiter zweifelhaft.

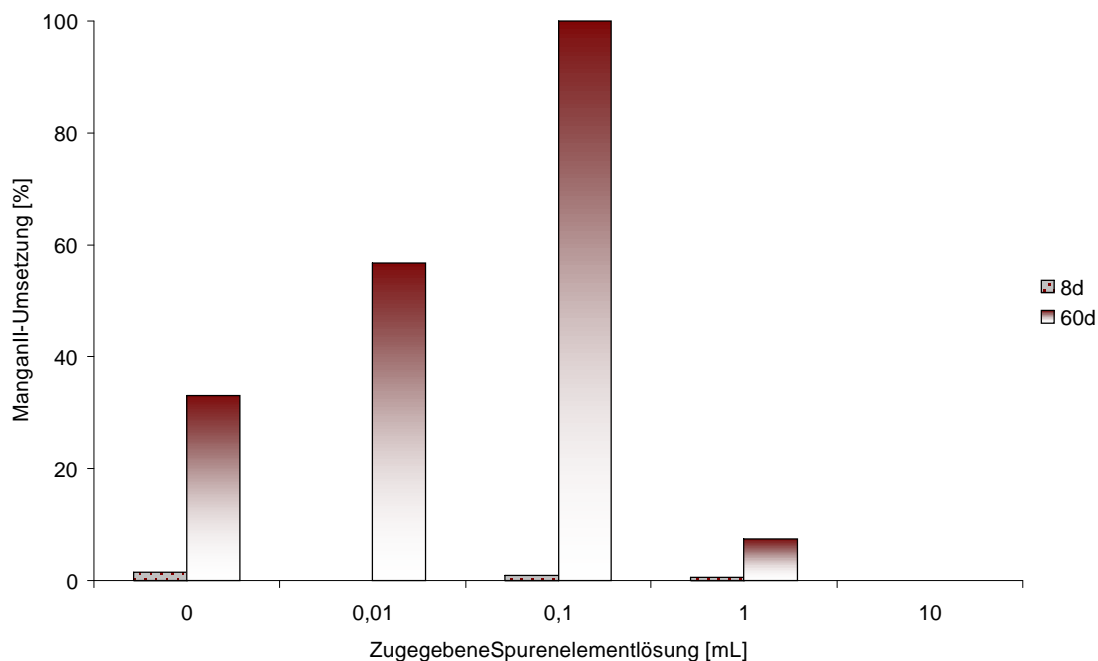


Abb. 100 Isolat D1 - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 8 und nach 60d. Deutlich zu erkennen ist die verbesserte Manganoxidation durch Zugabe von 100µL Spurenelementlösung, aber auch die Hemmung der Manganoxidation bei noch stärkerer Zugabe

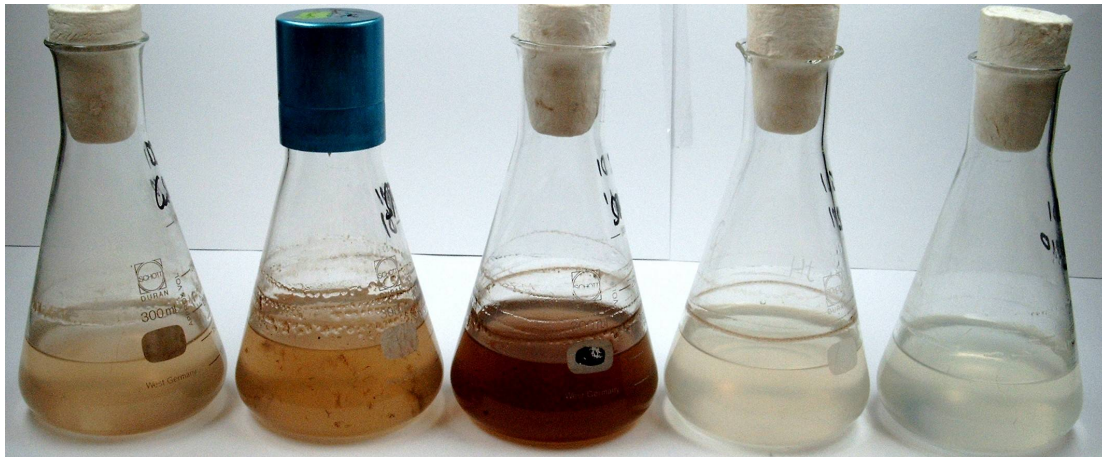


Abb. 100a Batch-Ansätze des Isolats D1 nach 60d Inkubation bei $T = 25^{\circ}\text{C}$. v.l.: 0, 10 μl , 100 μl , 1mL und 10mL Zugabe der Spurenelementlösung. Offenbar ist die Manganoxidation bei geringen Zugaben von Spurenelementen bevorzugt. Höhere Konzentrationen (1mL und 10mL der Spurenelementlösung hemmen hingegen die Manganoxidation.

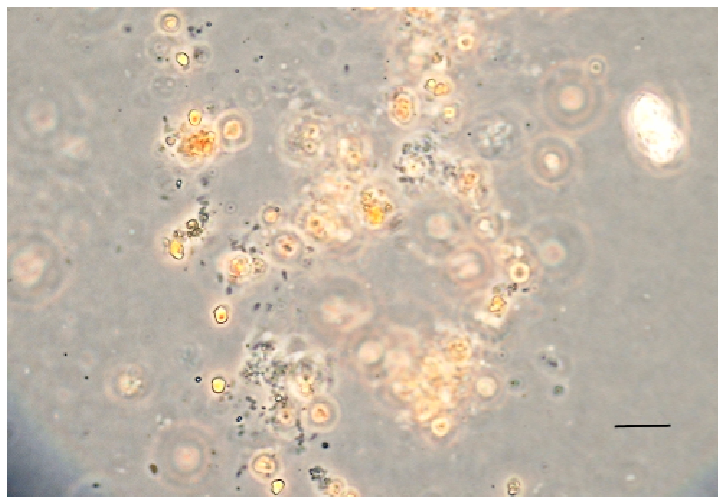


Abb. 101 Isolat D1 nach 60d Inkubation ohne Zugabe von Spurenelementlösung - es sind einige wenige Kapseln erkennbar.

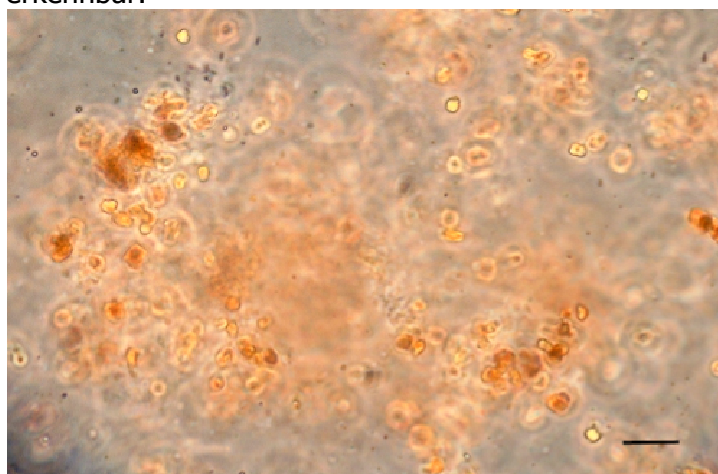


Abb. 102 Isolat D1 nach 60d Inkubation mit 100 μl Spurenelementlösung - es ist viel verockertes Kapselmateriale im Medium vorhanden.

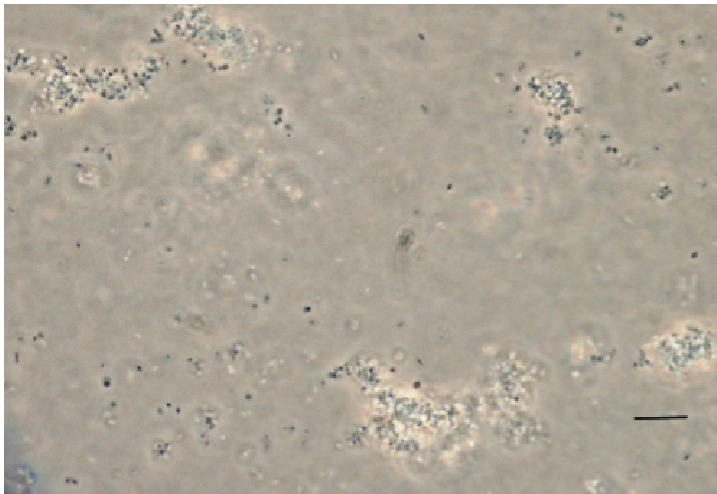


Abb. 103 Isolat D1 nach 60d Inkubation mit 10mL Spurenelementlösung - es ist kein verockertes Kapselmateriale Im Medium vorhanden. Die – beweglichen - Zellen liegen frei vor.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Abhängigkeit der Spurenelementkonzentration auf die Manganoxidation zeigen ähnliche Ergebnisse, wie die unter 3.9.1-3.9.5 beschriebenen Untersuchungen. **Das Isolat R4 zeigt auch unter den hier getesteten Bedingungen die geringsten Einflüsse äußerer Faktoren auf die Manganoxidation.** Isolat KIN fällt erst bei hohen Spurenelementzugaben im Medium ab, ähnliches zeigen die Isolate L1 und Th, die im unteren und mittleren Konzentrationsbereich durchaus schnelle Umsetzungsraten zeigen. **Isolat D1** kristallisiert sich hingegen erneut **für den technischen Einsatz als unbrauchbar**, da die Manganoxidation zu langsam vor sich geht. Da die Wässer mit den eingesetzten Spurenelementkonzentrationen noch voll verkehrsfähig wären, **ist beim Einsatz von Mikroorganismen für die Entmanganung von Wässern darauf zu achten, ob Spurenelemente eine zu hohe Konzentration für die manganoxidierende Mikroflora aufweisen und die Manganoxidation zumindest verzögern können.**

3.9.6 Der Einfluss der KupferII-Konzentration auf die Manganoxidation

KupferII spielt offenbar bei der enzymatischen Manganoxidation eine zentrale Rolle. Adams [ADAMS ET AL. 1986] hat dargelegt, dass für die Manganoxidation bei *Leptothrix discophora* ein kupferhaltiges Enzym verantwortlich ist. Daher wurde auch

bei anderen manganoxidierenden Isolaten der Einfluss der Kupferkonzentration im Medium auf die Manganoxidation untersucht. Beim Isolat *Pseudomonas putida* GB-1-002 konnte demnach die Manganoxidation durch Zugabe von CuII ins Medium um den Faktor 5 verstärkt werden [BROUWERS ET AL. 1999]. NickelII und ZinkII zeigten diesen Effekt nicht, sondern hemmten die Manganoxidation. Das Optimum lag bei 40µmol/L CuII und auch höhere Zugaben von CuII ins Medium hatten auf die Wachstumsraten keinen Einfluss. Browsers vermutete, dass ähnliche Systeme in allen manganoxidierenden Mikroorganismen vorkommen könnten [eine Übersicht liefert BROWERS 2000]. Auch Larsen [LARSEN ET AL. 1999] schloss auf einen Cu-abhängigen enzymatischen Prozess, der zur Manganoxidation führt. Er konnte zeigen, dass die Zugabe einer kupfer(II)komplexierenden Substanz die Manganoxidation von *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 hemmt. Durch erneute CuII-Zugabe konnte auch die Manganoxidation wieder induziert werden.

Da KupferII schon in geringen Konzentrationen als starkes Gift für niedere Organismen gilt, ist es nicht verwunderlich, dass Bromfield [Übersicht bei EHRlich 2000] eine Manganoxidationshemmung durch zugefügtes CuII beschreibt. Auch Adams [ADAMS ET AL. 1997] benennt eine Hemmung der Manganoxidation durch CuII-Konzentrationen über 100µmol/L.

Dieser scheinbare Widerspruch kann nur durch verschiedene Systeme bzw. unterschiedliche Toleranzwerte der Manganoxidation gegenüber Cu-Ionen erklärt werden.

Es ist daher zu untersuchen, ob Effekte auch bei den hier vorliegenden Isolaten zu beobachten sind. Dies würde wichtige Erkenntnisse für die technische Anwendung der Isolate als Starterkulturen mit sich bringen. Wässer mit leicht erhöhtem Cu-Gehalt könnten daher für die Manganoxidation deutlich besser geeignet sein, als Wässer, deren CuII-Gehalt zu gering ist.

Zur Untersuchung wurde dem flüssigen Basismedium aus einer Stammlösung CuSO₄ zugegeben, so dass folgende Endkonzentrationen CuII erreicht wurden:

0 µmol/L, 0,1µmol/L; 1µmol/L; 10µmol/L und 100µmol/L

3.9.6.1 Isolat Th – Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation

Der Einfluss der Cu-Ionenkonzentration auf die Manganoxidation ist bei Isolat Th nur gering. Die Entmanganung nach Zugabe von 0,1µmol/L, bzw. 1µmol/L CuII ist nach 24h und nach 72h nur geringfügig höher, als ohne Zugabe. Nach 72h beträgt sie 90% ohne CuII-Zugabe, mit 0,1µmol/L bzw. 1µmol/L ist die ManganII-Oxidation zu 100% erfolgt (vgl. Abb. 104-105). **Die scheidengebundene Manganoxidation ist also offensichtlich nicht entscheidend von der Cu-Ionenkonzentration im Medium abhängig.** Da auch das Medium ohne Cu-Zugabe nicht zu 100% als Cu-frei angesehen werden kann (Verunreinigungen in den Medienbestandteilen), kann geschlossen werden, dass die dort enthaltenen Cu-Konzentrationen bereits für eine effektive Manganoxidation ausreichen. Der Einsatz der Entmanganungsstarterkultur Th ist also auch in kupferärmeren Wässern denkbar.

Es wird aus den Ergebnissen aber auch deutlich, dass **hohe Cu-Ionenkonzentrationen die Entmanganung deutlich hemmen können.** So beträgt die Entmanganungsleistung von Isolat Th nach Zugabe von 10µmol CuII nach 72h nur 50%, nach Zugabe von 100µmol/L CuII gar nur 10%. Der Einsatz des Isolats Th in Wässern, mit derart großen Cu-Konzentrationen könnte daher bei der Entmanganung zu Problemen führen. Die Mineral- und Tafelwasserverordnung gibt keinen Grenzwert für Cu an, in der Richtlinie 2003/40/EG wird erst ab 2006 ein Grenzwert für Kupfer in Mineralwasser von 1mg/L wirksam. Legt man den Grenzwert für Trinkwasser (Anlage 2 TeilII zu §6Abs. 2) zugrunde, so ist die dort angegebene Höchstkonzentration von 2mg/L (entspricht ca. 31µmol/L) bereits deutlich zu hoch für eine optimale Manganoxidation durch Isolat Th. Das gilt ebenso für den künftigen Grenzwert im Mineralwasserrecht (ca.15µmol/L). Die Ursache für die ausbleibende Manganoxidation bei erhöhten CuII-Konzentrationen liegt in einer **Hemmung der Scheidenbildung**, wie aus den Abb. 106 bis 108 hervorgeht.

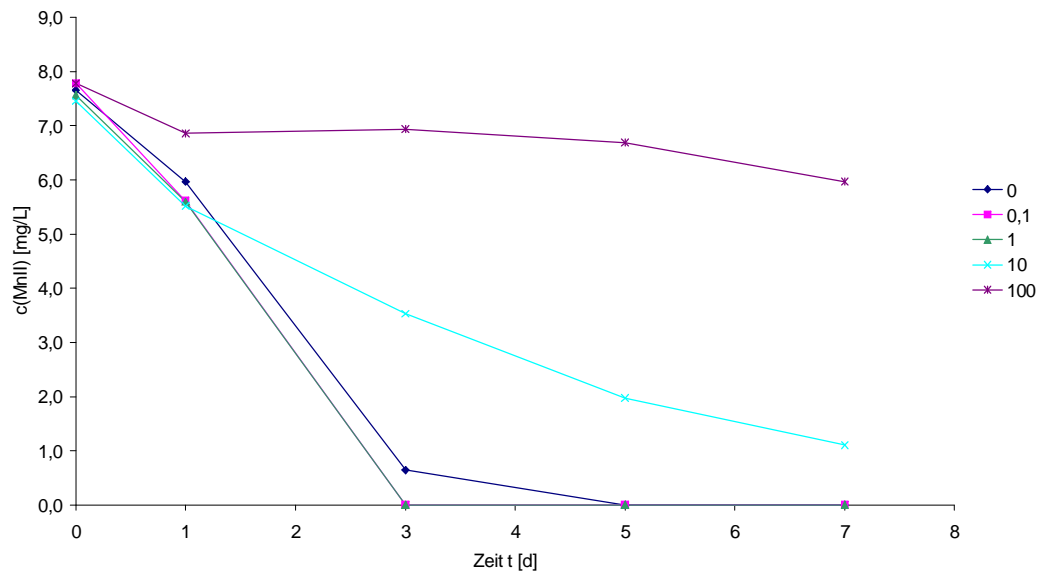


Abb. 104 Isolat Th - Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation. Deutliche Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat Th durch Nichtzugabe von Cu-Ionen, aber auch Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Cu-Ionen ($>10\mu\text{mol/L}$)

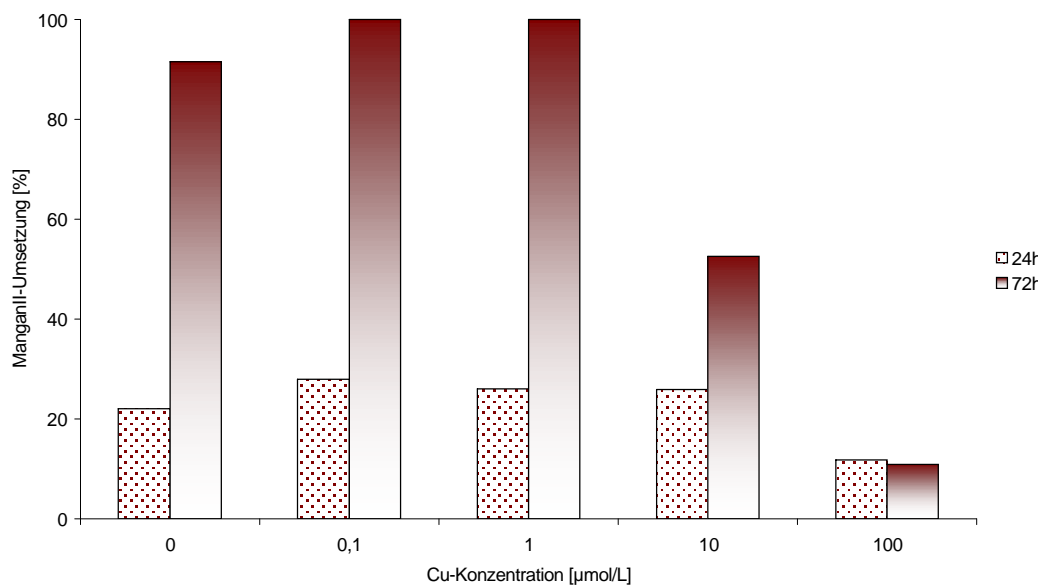


Abb. 105 Isolat Th - Prozentuale ManganII-Umsetzung nach 24h und nach 72h. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Isolat Th Zugabe von Cu-Ionen im Konzentrationsbereich $0,1/1\mu\text{mol/L}$, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen ($>10\mu\text{mol/L}$)

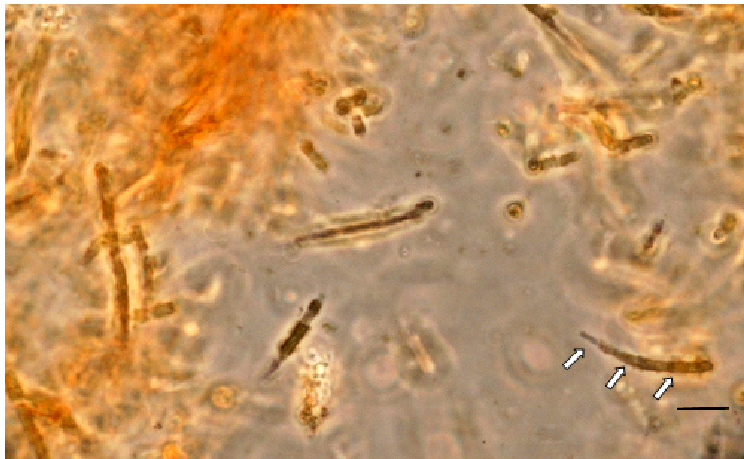


Abb. 106 Isolat Th - Phasenkontrast-Aufnahme 0,1µmol/L Cu;
lange Scheiden (ca. 40µm Länge) Balken = 10µm



Abb. 107 Isolat Th - Phasenkontrast-Aufnahme $c(\text{Cu}) = 1\mu\text{mol/L}$
etwas kürzeres Scheidenwachstum (ca. 20µm) (Balken = 10µm)



Abb. 108 Isolat Th - Phasenkontrast-Aufnahme $c(\text{Cu}) = 10\mu\text{mol}$
kein erkennbares Scheidenwachstum, nur einzelne Zellen
(Balken = 10µm)



Abb. 109 Isolat Th - Batch-Ansätze nach 24h. v.l.: 0 $\mu\text{mol/L}$, 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$. Deutlich wird die Verzögerung der Manganoxidation durch erhöhte Kupferzugaben.

3.9.6.2 Isolat L1 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation

Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation wird bei Isolat L1 deutlicher, als bei Isolat Th. Nach 24h sind die Medien mit 0,1 bzw. 1 $\mu\text{mol/L}$ zu 80-90% vom ManganII befreit. **Ohne Zugabe von CuII ist praktisch noch keine ManganII-Oxidation erkennbar.** Nach 72h ist in allen drei Medien kein MnII mehr nachweisbar(vgl. Abb. 110-111) Dies veranschaulicht, wie sehr die Geschwindigkeit der Manganoxidation durch mäßige Zugaben von CuII zum Medium stimuliert werden kann. **Die Manganoxidation über Haftscheiben ist stärker von der Cu-Konzentration im Medium abhängig, als die scheidengebundene Manganoxidation.**

Auch Isolat L1 zeigt eine Hemmung der Manganoxidation durch eine überhöhte CuII-Konzentration (10 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/L}$). Dies liegt an einer Hemmung der Bildung von Haftscheiben, wie aus den Abb. 112 und 113 hervorgeht.

Der Einsatz als Starterkultur ist daher in Habitaten mit weniger als 10 $\mu\text{mol/L}$ CuII gut denkbar, bei höheren Konzentrationen ist hingegen mit Problemen zu rechnen.

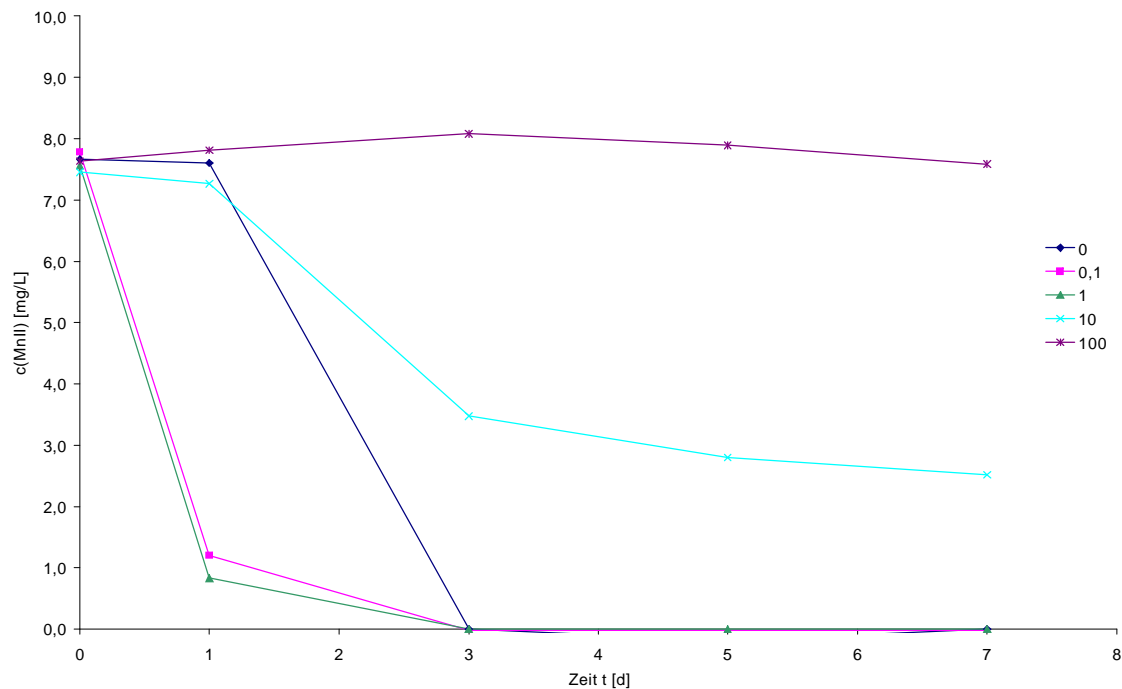


Abb. 110 Isolat L1 – Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Isolat L1 Zugabe von Cu-Ionen im Konzentrationsbereich 0,1/1µmol/L, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (>10µmmol/L)

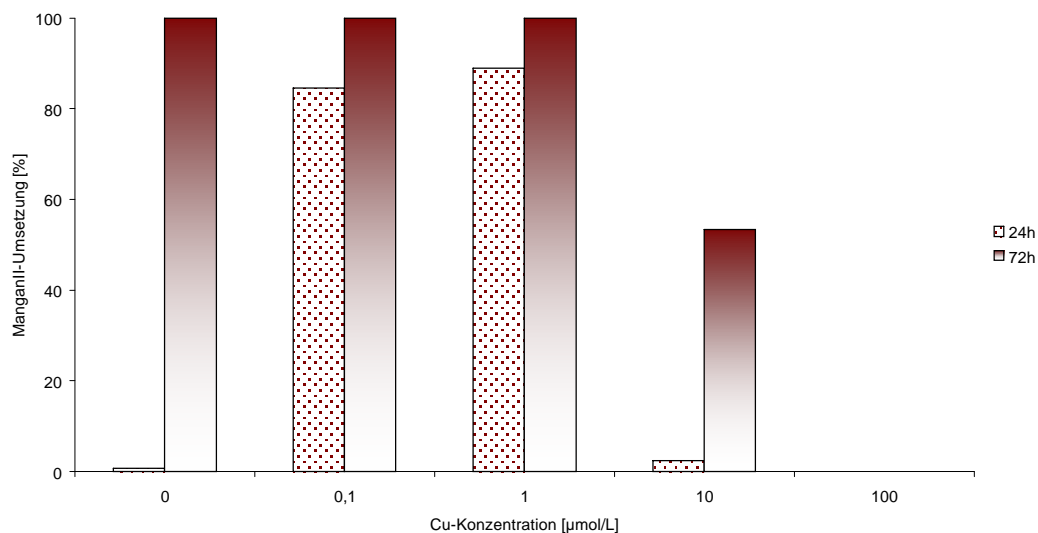


Abb. 111 Isolat L1 - Prozentuale ManganII-Umsetzung nach 24h und nach 72h in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration im Medium. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Zugabe von Cu-Ionen im Konzentrationsbereich 0,1/1µmol/L, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (>10µmmol/L)



Abb. 112 Isolat L1 - Cu (0,1µmol/L) nach 24h Inkubation. Verkrustete Holdfasts sind deutlich erkennbar. (Balken = 10µm)

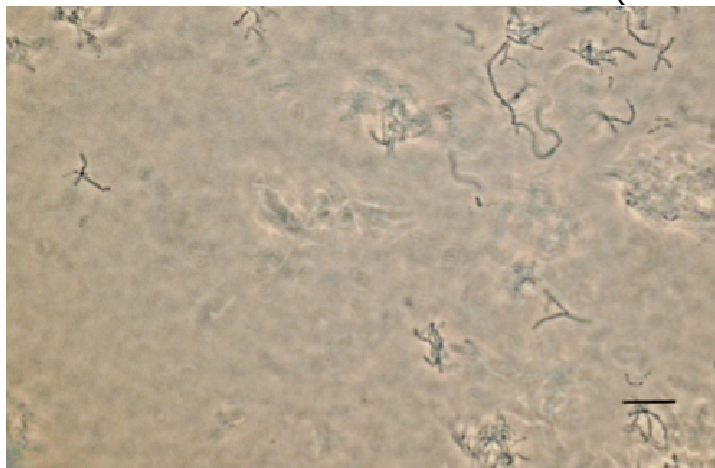


Abb. 113 Isolat L1 - Cu (100µmol/L) nach 24h. Keine Holdfasts erkennbar, keine Mn-Oxidation, dünnere Zellen (Balken = 10µm)

3.9.6.3 Isolat R4 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation

Der stimulierende Effekt durch CuII-Zugabe ist bei Isolat R4 weniger stark ausgeprägt, als bei Isolat L1. Nach 24h bringen 0,1µmol/L bzw. 1µmol/L Zugabe ins Medium nur eine geringe Steigerung der Manganoxidation (ohne Zugabe ca. 40%ige Umsetzung, mit 0,1µmol/L bzw. 1µmol/L je ca. 50%). Nach 72h sind alle Medien bis zu einer CuII-Zugabe von 10µmol/L MnII-frei. Auch der hemmende Effekt ist also deutlich schwächer ausgeprägt, als bei den anderen untersuchten Leptothrix-Arten.

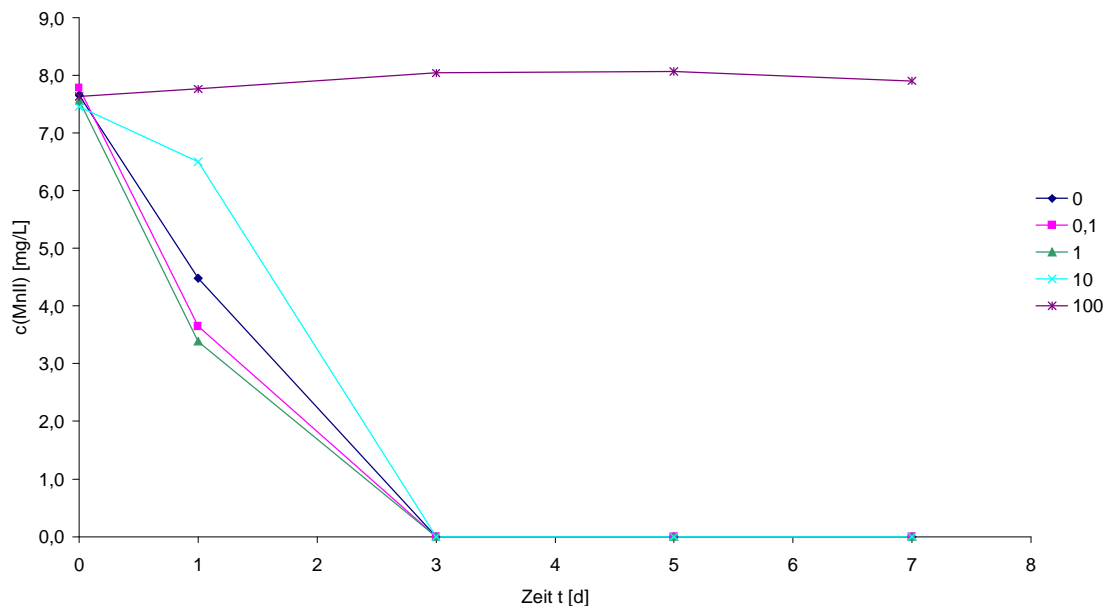


Abb. 114 Isolat R4 - Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation. Leichte Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat R4 durch Nichtzugabe von Cu-Ionen, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Cu-Ionen ($>10\mu\text{mol/L}$)

Bei $100\mu\text{mol/L}$ CuII im Medium findet aber auch bei Isolat R4 keine Manganoxidation im Versuchsverlauf mehr statt (vgl. Abb. 114-115). Dies liegt an der fehlenden Scheidenbildung (vgl. Abb.116-117). Bei kupferreichen Wässern bis zu einer Cu-Konzentration von $10\mu\text{mol/L}$ ($= 0,6\text{mg/L}$) kann aber offenbar eine Manganoxidation durch Isolat R4 gewährleistet werden. Über dieser Konzentration sind hemmende Effekte durch CuII nicht auszuschließen, so dass auch bei der Manganoxidation durch Isolat R4 schon in Wässern mit CuII-Konzentrationen unterhalb des Grenzwertes der TWV mit Schwierigkeiten bei der Manganoxidation gerechnet werden muss.

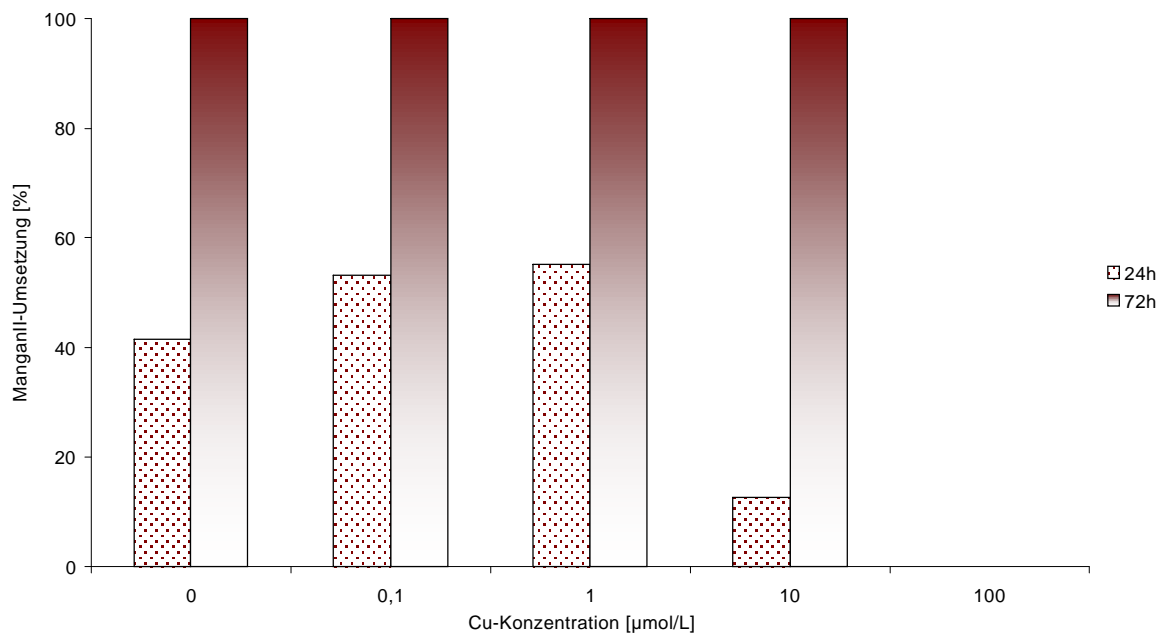


Abb. 115 Isolat R4 - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 24h und nach 72h. Optimum der Manganoxidation durch Zugabe von Cu-Ionen im Konzentrationsbereich 0,1/1μmol/L; eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (>10μmmol/L);

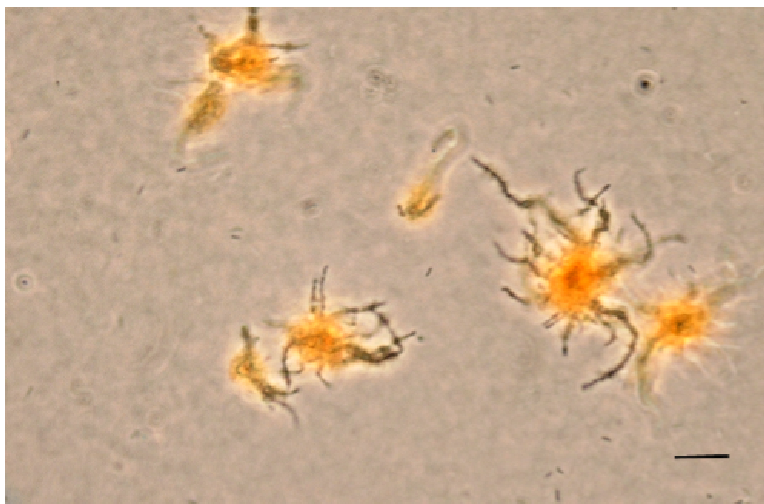


Abb. 116 Isolat R4 (1μmolCu) nach 72h Inkubation. Typische sternförmige Strukturen mit MnIV-verkrusteten Zentren. (Balken = 10μm)

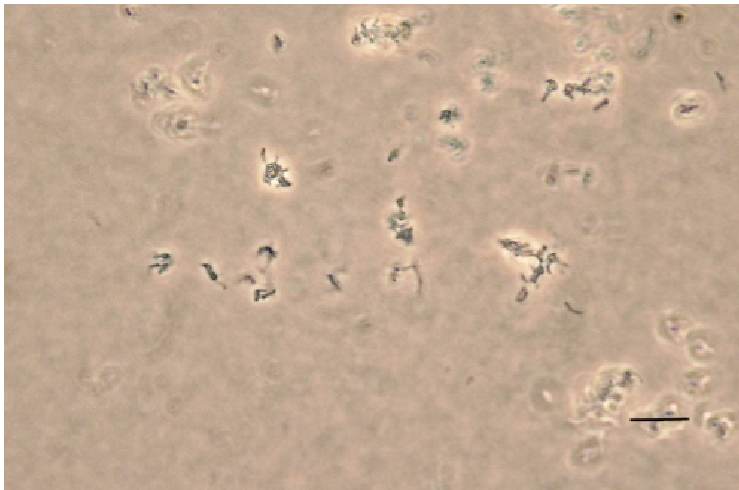


Abb. 117 Isolat R4 (100 $\mu\text{mol Cu}$) nach 72 h Inkubation. Keine Anzeichen für Manganoxidation erkennbar. Die Zellen liegen einzeln oder in kurzen Einheiten zusammen (Baken = 10 μm).

3.9.6.4 Isolat KIN – Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation

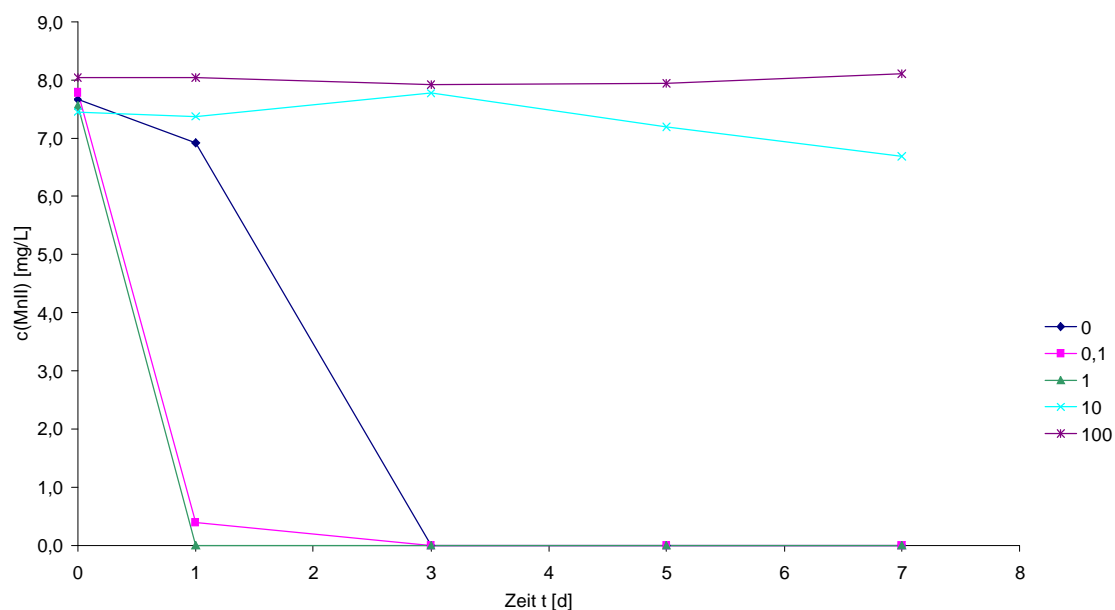


Abb. 118 Isolat KIN – Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation. Deutliche Verzögerung der Manganoxidation bei Isolat Th durch Nichtzugabe von Cu-Ionen, aber auch eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen von Cu-Ionen ($>10 \mu\text{mol/L}$)

Auch bei Isolat KIN ist auffällig, **dass durch geringe CuII-Zugaben die Manganoxidation stimuliert wird**. Nach 24h sind ohne Cu-Zugabe lediglich ca. 10% des MnII zu MnIV oxidiert, bei Zugabe von 0,1 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 1 $\mu\text{mol/L}$ CuII sind

dies bereits 90% bzw. 100%. Nach 72h ist in allen drei Medien die Manganoxidation quantitativ erfolgt. Höhere Konzentrationen (10µmol/L und 100µmol/L) hemmen hingegen. Es findet keine Manganoxidation mehr statt (vgl. Abb. 118-120). **Ein Einsatz des Isolats KIN als Starterkultur ist daher bei überhöhten CuII-Konzentrationen im Habitat nicht problemfrei erreichbar, wird aber durch CuII in Konzentrationsbereichen zwischen 0,1 und 1µmol/L deutlich stimuliert.**

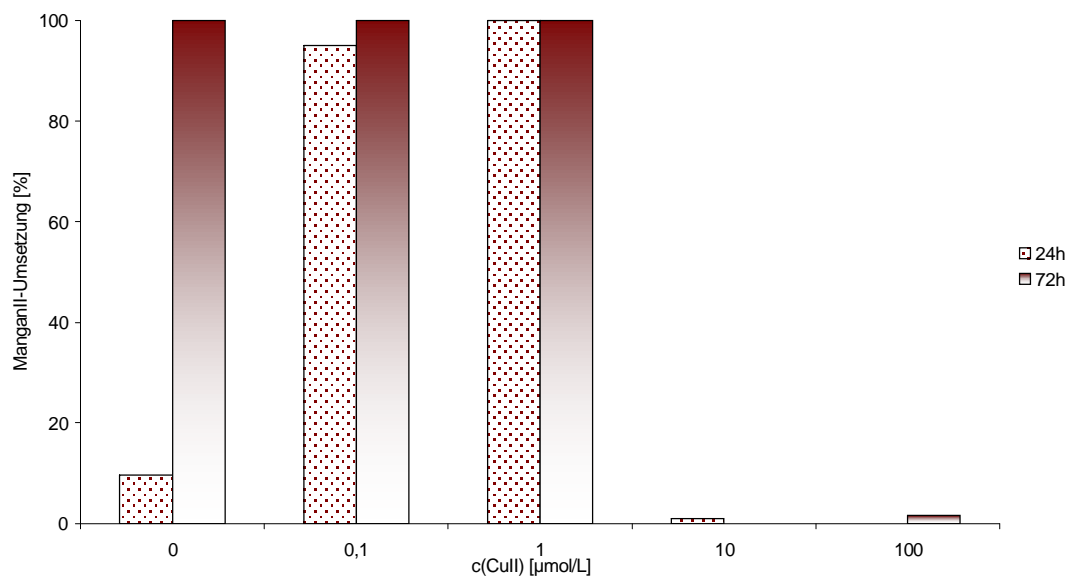


Abb. 119 Isolat KIN - Prozentuale ManganII-Umsetzung nach 24h und 72h in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration. Deutliches Optimum der Manganoxidation bei Isolat KIN Zugabe von Cu-Ionen im Konzentrationsbereich 0,1 - 1µmol/L, aber auch ganz eindeutige Hemmung der Mn-Oxidation bei höheren Dosierungen (>10µmmol/L)

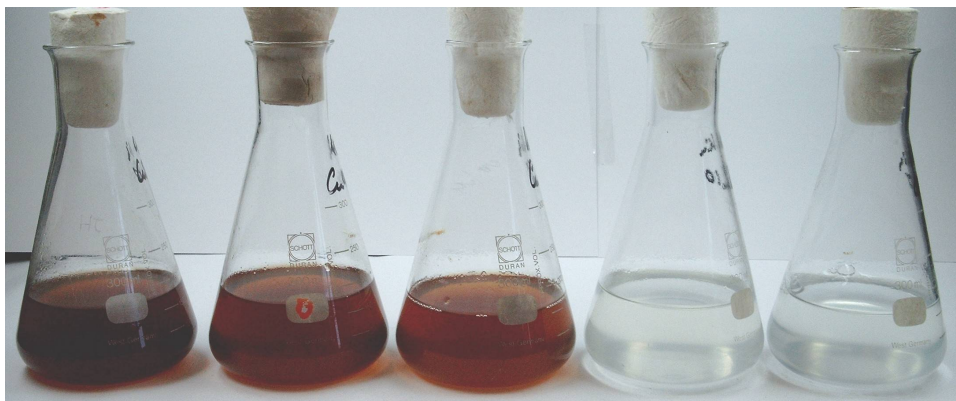


Abb. 120 Batch-Ansätze zur Kupferionenabhängigkeit der Manganoxidation durch Isolat KIN nach 72h Inkubation. Die Ansätze mit den Konzentrationen 10µmol/L und 100µmol/L bleiben blank. Es findet keine Manganoxidation statt.

3.9.6.5 Isolat D1 - Der Einfluss der Kupferkonzentration auf die Manganoxidation

Auch Isolat D1 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Manganoxidation von der CuII-Ionen-Konzentration im Medium. Bei Zugabe von 0,1 μmol CuII sind nach 43d Inkubation über 90% des ManganII zu ManganIV umgesetzt. Ohne Cu-Zugabe sind dies erheblich weniger (ca. 30%). Bei höheren Cu-Mengen nimmt die positive Wirkung wieder ab. Bei Zugabe von 1 $\mu\text{mol/L}$ werden noch 64% umgesetzt, bei noch höheren Konzentrationen findet im Versuchszeitraum keine Manganoxidation statt. Die Ansätze mit 10 $\mu\text{mol/L}$ und 100 $\mu\text{mol/L}$ zeigen keine Kapselbildung durch Isolat D1 (vgl. Abb. 120-124).

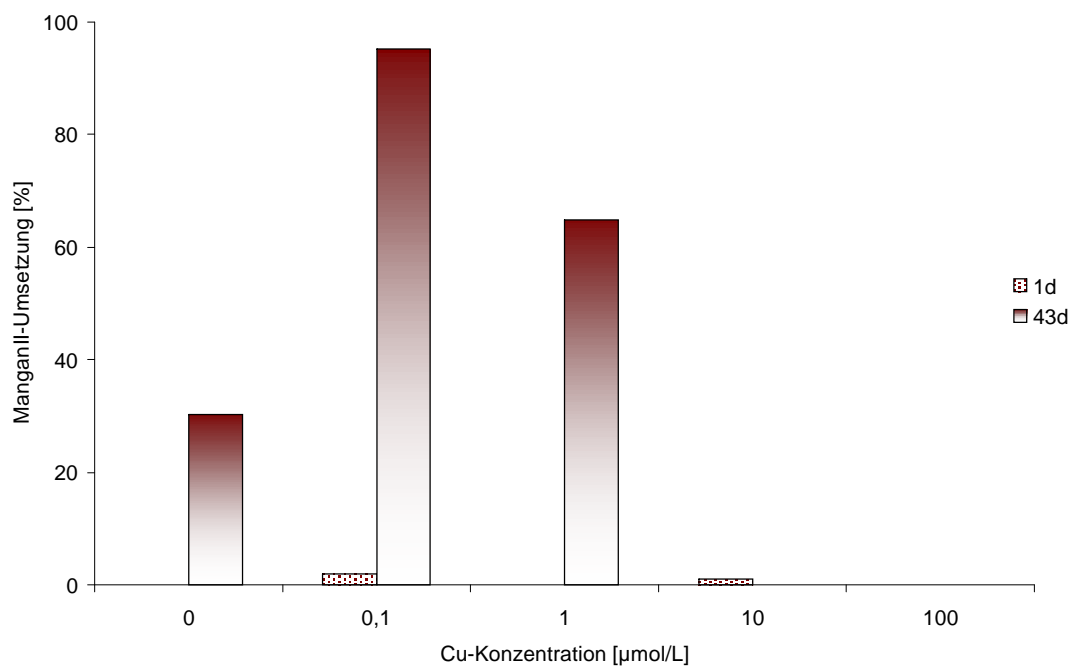


Abb. 121 Isolat D1 – prozentuale ManganII-Umsetzung nach 1d und nach 43d. Die Manganoxidation durch Isolat D1 wird durch die Zugabe von CuII-Ionen deutlich beschleunigt, bei Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/L}$ und mehr tritt eine Hemmung auf.

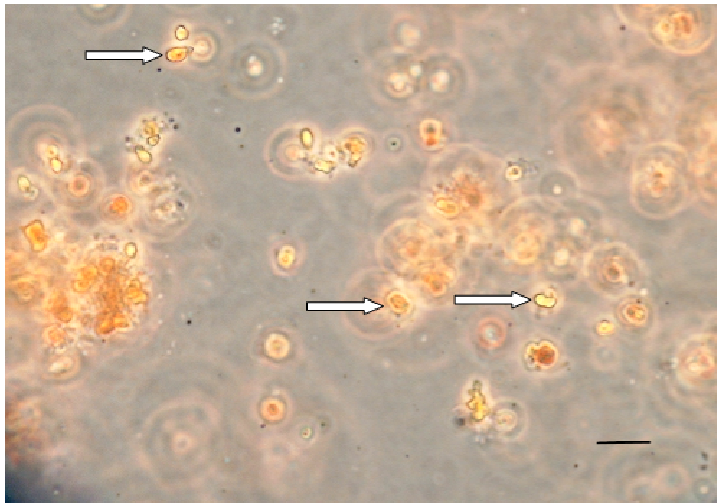


Abb. 122 Isolat D1 - nach Zugabe von 0,1µmol/L CuII und 43d Inkubation. Deutlich sichtbar sind die Kapseln, an denen die Manganoxidation stattfindet (Balken = 10µm).

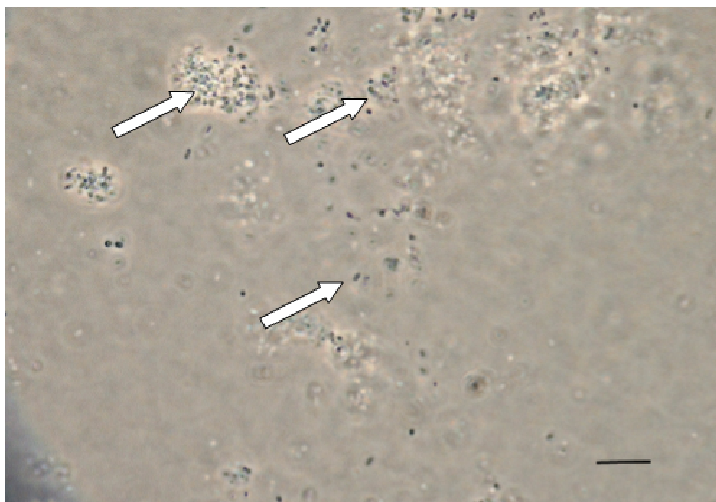


Abb. 123 Isolat D1 - nach Zugabe von 10µmol/L CuII und 43h Inkubation. Die Zellen liegen einzeln vor - keine Kapselbildung und keine Veroockerung (Balken = 10µm).

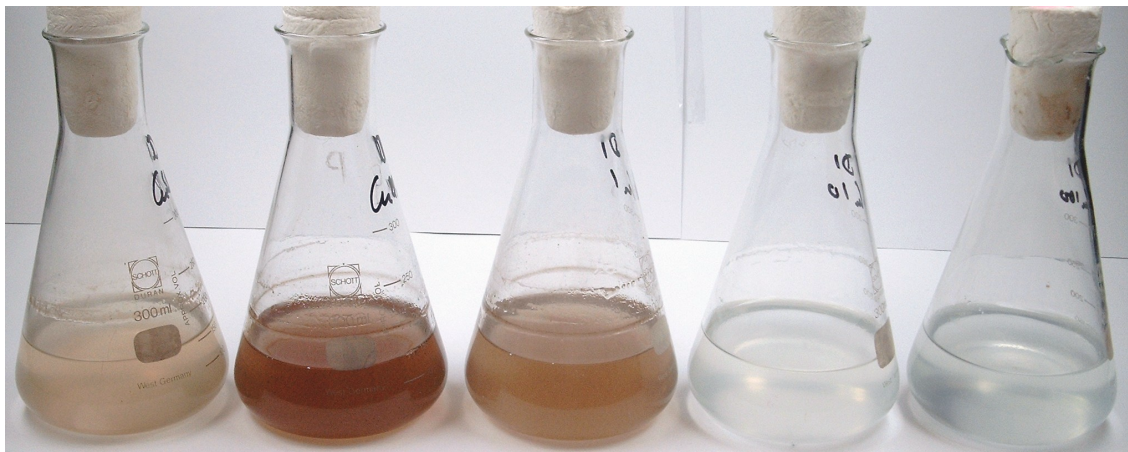


Abb. 124 Isolat D1 nach 43d. Deutliche Hemmung der Manganoxidation bei CuII-Zugaben von 10µmol/L und 100µmol/L. Die optisch beste Manganoxidation findet bei 0,1 µmol/L statt.

Manganoxidierende Mikroorganismen reagieren oft empfindlich auf CuII-Konzentrationen von über 10µmol/L, was sich in einem Ausbleiben der Manganoxidation bemerkbar macht. Während die untersuchten kapselbildenden Isolate D1 und KIN die Manganoxidation bei dieser Grenzkonzentration völlig einstellen, ist die Manganoxidation von *Leptothrix lopholea* und den *L. discophora*-Varianten weniger stark gehemmt und wird bei 10µmol/L nur verzögert. Erst bei 100µmol/L (entspricht ca. 6mg/L) bleibt sie völlig aus. In sauren Gewässern lösen sich Kupferionen bevorzugt. Dies könnte ein Grund für viele vergebliche Versuche einiger mineralwasserproduzierender Betriebe sein, eine natürlich-biologische Manganoxidation in der Aufarbeitung zu etablieren.

Im Allgemeinen wird dem Gehalt an Cu im Mineralwasser nur wenig Beachtung geschenkt, da es keine Grenzwertvorgaben in der MTV gibt. Im Zusammenhang mit der Manganoxidation kann er aber durchaus relevant werden, wie die Untersuchungen der vorliegenden Isolate zeigt.

3.9.7 Der Einfluss der ManganII-Konzentration auf die Manganoxidation

In den zur Trink- oder Mineralwasserherstellung genutzten Brunnenanlagen herrschen verschiedenste Konzentrationen von gelösten Salzen und Spurenelementen vor. So finden sich Eisenkonzentrationen bis 20mg/L [EHRlich 2000]. Auch ManganII kommt in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Konzentrationen von über 5 mg/L sind selten, können aber im Ausnahmefall vorkommen [KITTNER 1967].

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass einige untersuchte Stämme höchst unterschiedlich auf erhöhte Mangankonzentrationen reagieren (vgl. 3.6.1). Während einige Stämme bei erhöhten Konzentrationen von ManganII (100mg/L) kein Wachstum mehr zeigten, stellten andere „lediglich“ die Manganoxidation, nicht aber das Wachstum ein. Für eisenoxidierende Mikroorganismen ist bereits eine Grenzkonzentration (zwischen 14 und 17mg/L) von EisenII für die Eisenoxidation beschrieben worden [HÄSSELBARTH/LÜDEMANN 1971]. Adams [ADAMS ET AL. 1985] beschreibt, dass sein *Leptothrix*-Isolat SS1 bei hohen ManganII-Konzentrationen das

Wachstum einstellt. Ehrlich [EHRlich 2000] vermutet, dass dies daran liegt, dass das Isolat SS1 (nicht-scheidenbildend) ManganIV direkt auf der Zelle ablagert, welches durch autokatalytische Bindung und Ausfällung der Zelle essentielles EisenII vorenthält. In einer weiteren Arbeit stellt Adams [ADAMS ET AL. 1987] fest, dass das Wachstum von Isolat SS1 bei 50mg/L MnII im Medium zu 90% unterbunden wird. Bei 100mg/L tritt zunächst eine Abnahme der Zellzahl und später ein verzögerter Anstieg der Zellzahl statt. Adams deutet dies als einsetzende Resistenz. Eine Erklärung für die Hemmung des Zellwachstums und der Manganoxidation durch hohe ManganII-Konzentrationen gibt Adams nicht.

Es gilt nun zu prüfen, inwieweit die fünf Isolate auf verschiedene ManganII-Konzentrationen reagieren und wo kritische Konzentrationen für die einzelnen Isolate liegen, bei denen die Manganoxidation eingeschränkt oder gestoppt wird.

Zur Untersuchung wird das flüssige, gepufferte Basismedium mit folgenden ManganII-Konzentrationen genutzt: 0,4mg/L, 3mg/L, 7mg/L, 15mg/L und 75mg/L. Nach 24h haben vier der fünf Isolate die im Medium enthaltenen 0,4 mg/L MnII quantitativ entfernt (vgl. Abb.125 und 126). Lediglich Isolat D1 zeigt nach sechs

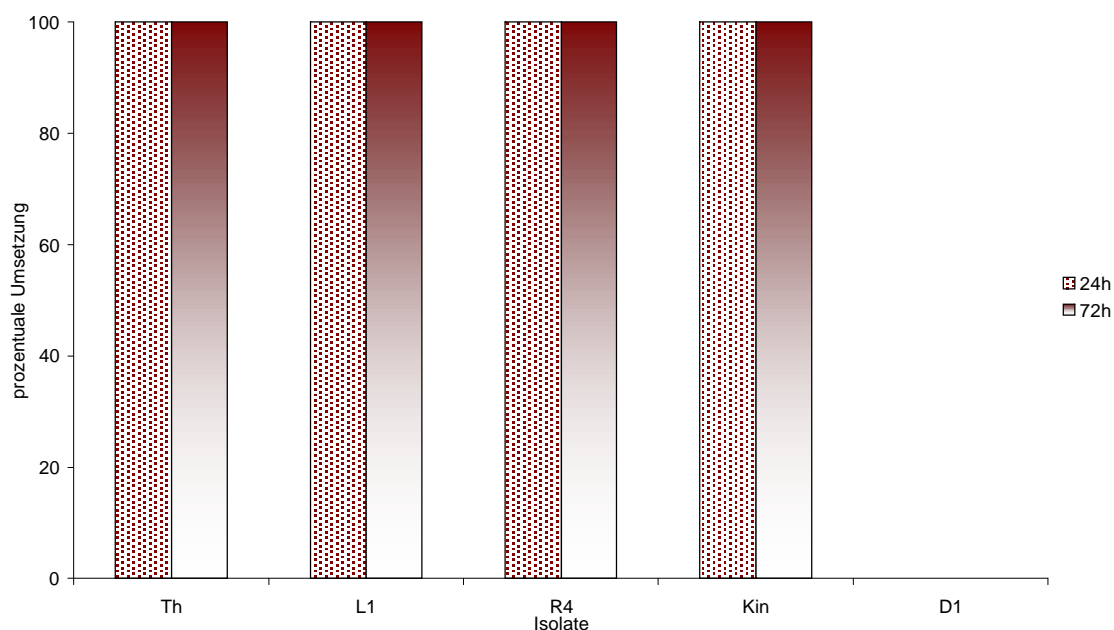


Abb. 125 Vergleich der prozentualen ManganII-Umsetzung der eingesetzten Isolate bei einem ManganII-Gehalt im Medium von 0,4 mg/L. Vier der fünf getesteten Isolate eliminierten 0,4mg/L ManganII aus dem gepufferten Basismedium C komplett innerhalb von 24h. Isolat D1 zeigt keine Manganoxidationstätigkeit.

Tagen keine Manganoxidaionsaktivität. Diese Mangankonzentration von 0,4mg/L ist bei natürlichen Grundwässern eine gängige Konzentration.

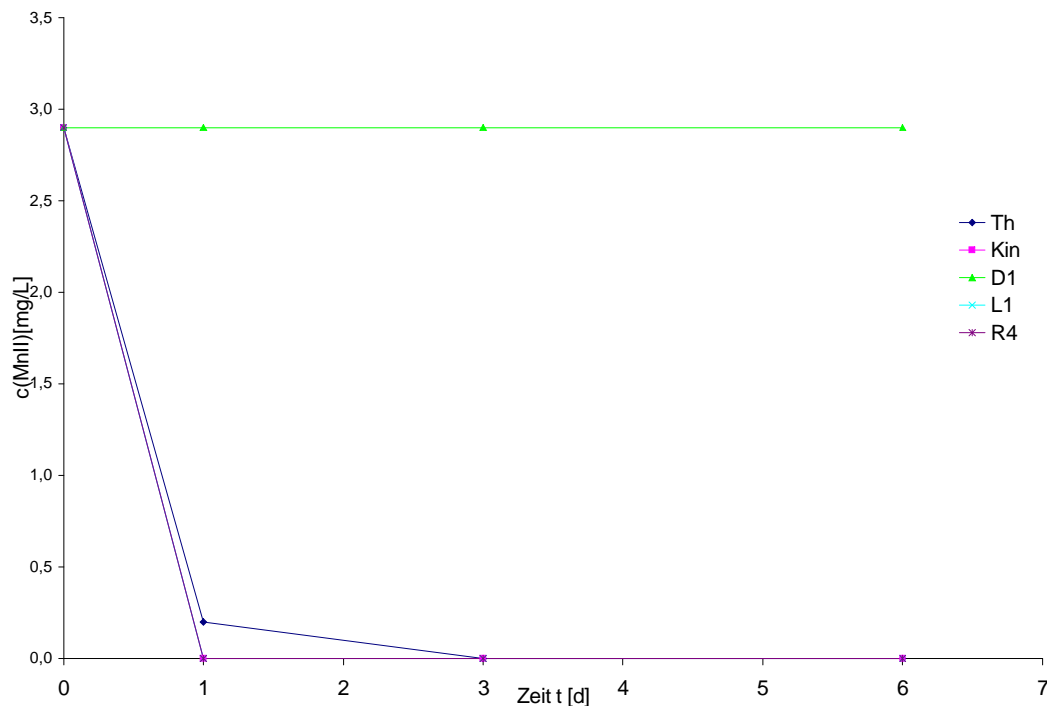


Abb. 126 Zeitlicher Verlauf der ManganII-Oxidation durch die getesteten Isolate. Die Isolate L1, R4 und KIN eliminieren 2,9 mg/L ManganII innerhalb von 24h. Isolat Th erreicht dies erst später, Isolat D1 zeigt in sechs Tagen keine Manganoxidaionsaktivität.

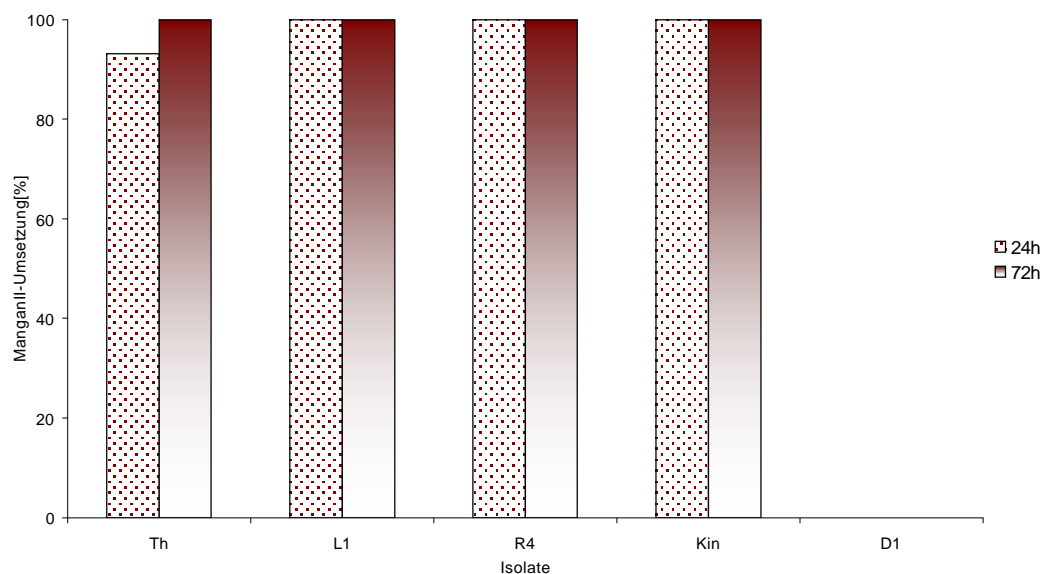


Abb. 127 Vergleich der prozentualen ManganII-Umsetzung der eingesetzten Isolate bei einem ManganII-Gehalt im Medium von 2,9 mg/L. Vier der fünf getesteten Isolate eliminieren 2,9 ManganII aus dem gepufferten Basismedium C komplett oder nahezu innerhalb von 24h. Isolat D1 zeigt keine Manganoxidaionsaktivität.

Bei einer eingestellten Mangankonzentration von 2,9 mg/L zeigen die Isolate L1, KIN und R4 erneut bereits nach 24h eine quantitative ManganII-Entfernung aus dem Medium (vgl. Abb.127 und 128). Isolat Th erreicht nach 24h bereits eine gut 93%ige Entmanganung, bei der nächsten Messung, nach drei Tagen ist auch hier im Medium kein ManganII mehr nachweisbar. Isolat D1 zeigt auch unter diesen Bedingungen keine Manganoxiationsaktivität im Versuchszeitraum. Alle anderen Isolate zeigen **keine negative Beeinflussung der Manganoxidation durch die eingestellte Mangankonzentration.**

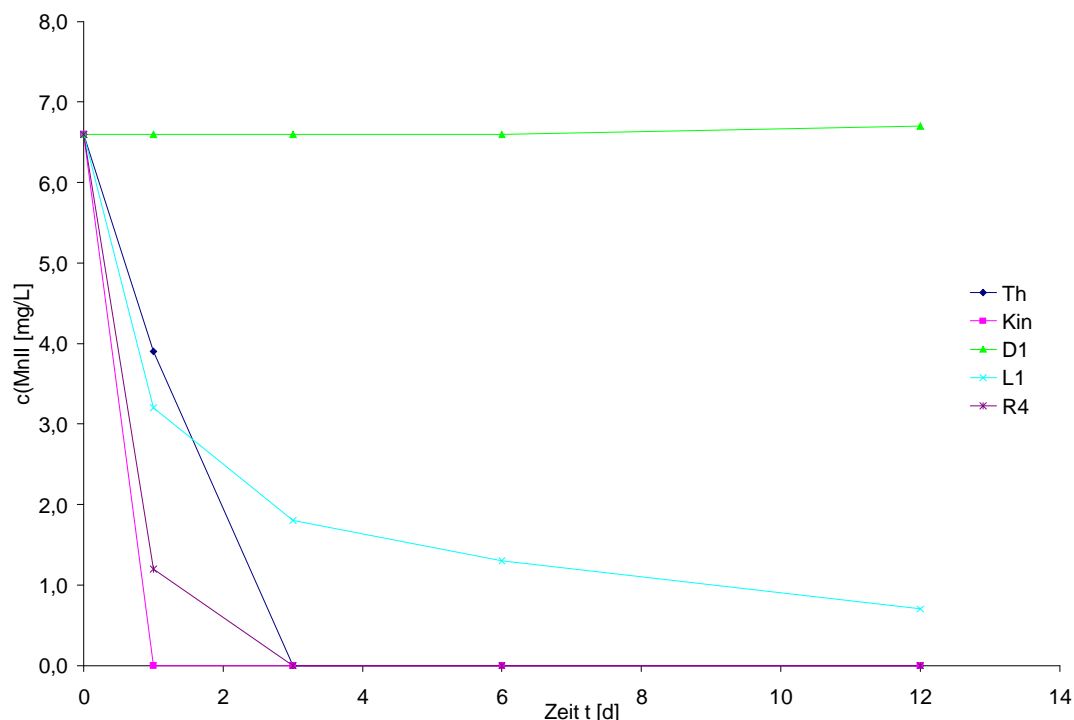


Abb. 128 Zeitlicher Verlauf der ManganII-Oxidation der untersuchten Isolate bei einem Mangangehalt im Medium von 6,6 mg/L. Lediglich Isolat KIN oxidiert die enthaltene Menge vollständig nach 24h. Isolat D1 zeigt im dargestellten Zeitbereich keine Manganoxidation.

Bei eingestellten 6,6 mg/L zeigt sich das Bild noch etwas differenzierter. Einzig Isolat KIN entfernt das ManganII auch unter diesen Bedingungen bereits nach 24h. Die Isolate Th, L1 und R4 zeigen Entfernungsraten von ca. 40, 50 und 80%. Nach weiteren 48h ist das ManganII in den Medien mit den Isolaten Th und R4 nicht mehr nachweisbar, während Isolat L1 zu dieser Zeit lediglich 73% Entmanganung bewirkt. **Bei überdurchschnittlichen ManganII-Konzentrationen scheinen die Isolate R4 und KIN eher geeignet zu sein, diese MnII-Frachten in kurzer Zeit aus dem Medium zu eliminieren.** Die Isolate Th und L1 benötigen dazu

mehr Zeit, was aber in der technischen Anwendung durch einen höheren Biomasseeinsatz ausgeglichen werden könnte.

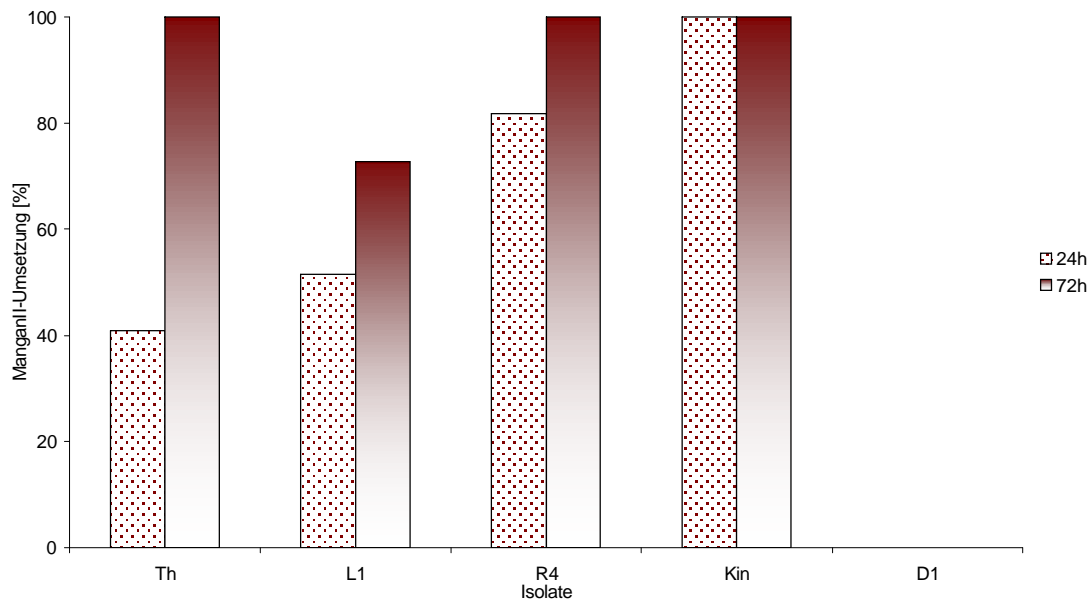


Abb. 129 Prozentuale Umsetzung von 6,6mg/L ManganII nach 24 und 72h durch die getesteten Isolate. Lediglich Isolat KIN oxidiert die enthaltene Menge vollständig nach 24h. Isolat D1 zeigt im dargestellten Zeitbereich keine Manganoxidation.

Isolat D1 zeigt erst nach 28d eine 20%ige Manganoxidation in diesem Medium mit einsetzender Kapsel- und Verockerungsbildung (nicht dargestellt).

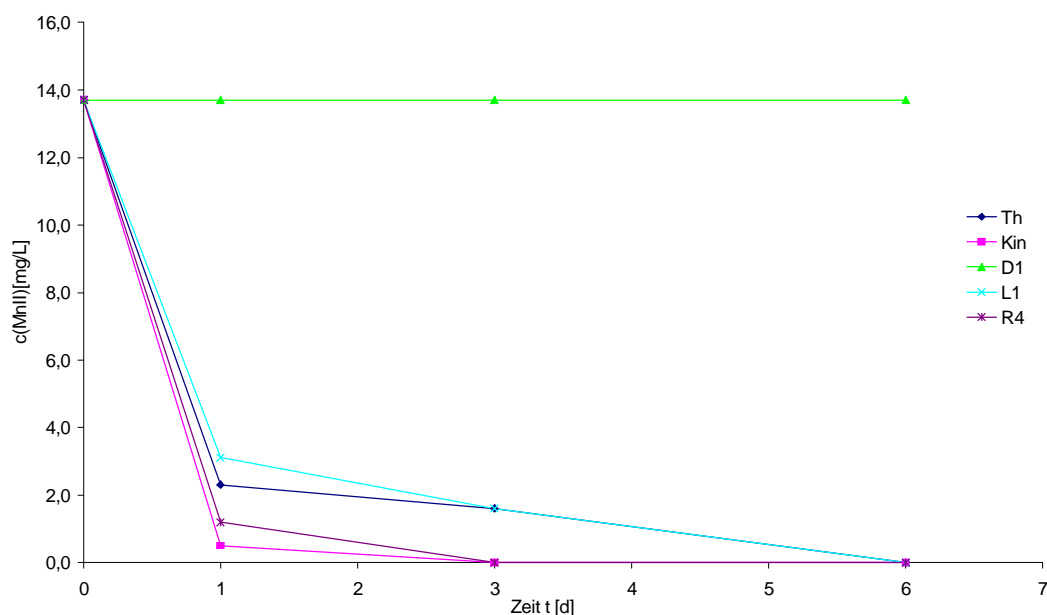


Abb.130 Vergleich der getesteten Isolate bei einer Ausgangskonzentration von 13,7mg/L MnII. Keiner der Stämme vermag 13,7 mg/L ManganII innerhalb von 24h zu eliminieren.

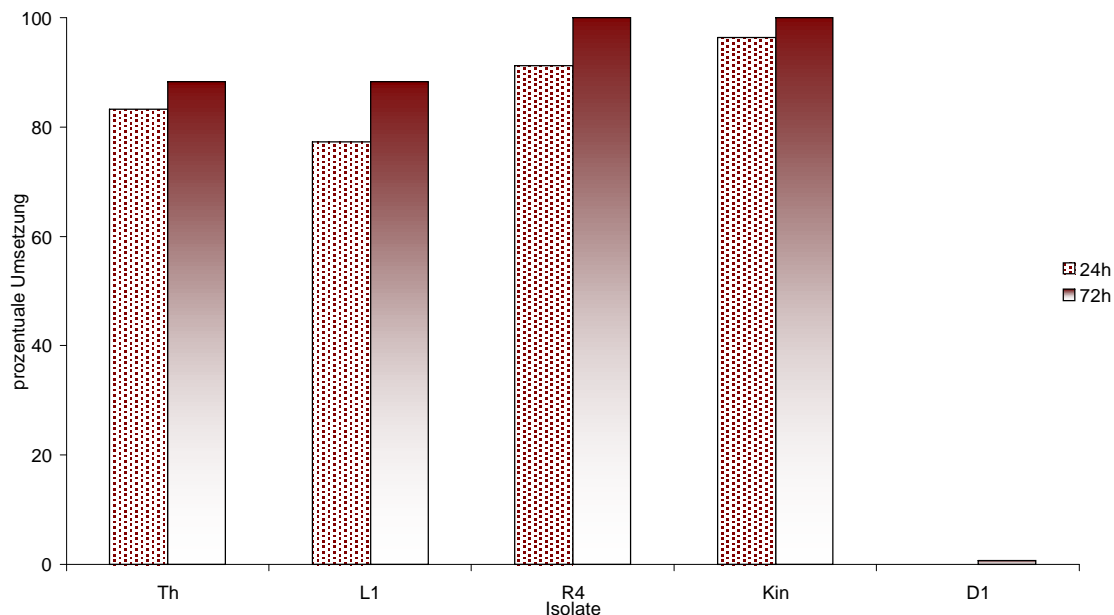


Abb. 131 Prozentuale Umsetzung von 13,7mg/L ManganII nach 24 und 72h durch die getesteten Isolate. Keiner der Stämme vermag 13,7 mg/L ManganII innerhalb von 24h zu eliminieren.

Eine weitere Erhöhung der ManganII-Konzentration im Medium bewirkt offenbar keine weitere Verschlechterung der Manganoxidentskapazität der untersuchten Stämme (vgl. Abb. 130-131). Die Isolate zeigen alle eine Entmanganungsrate von 75-96%, lediglich Isolat D1 zeigt erneut keine Entmanganungsaktivität in dem dargestellten Zeitraum (6d). Die zweite Messung nach 72h zeigt bei den Isolaten KIN und R4 eine quantitative ManganII-Entfernung. Die *Leptothrix discophora* -Stämme L1 und Th zeigen dies erst nach weiteren drei Tagen.

Eine ManganII-Konzentration von 74,1 mg/L bewirkt eine deutliche Hemmung der Manganoxidentsaktivität der untersuchten Isolate. Einzig das Isolat R4 zeigt mit über 50% Entmanganungsleistung eine nennenswerte Reduzierung des eingesetzten ManganII. Die Isolate D1 und L1 zeigen keinerlei signifikante Aktivität, während KIN und Th nur unter 20% des zugegebenen ManganII zu ManganIV umsetzen.

Die hier eingesetzte ManganII-Konzentration ist außerhalb jeder für Grundwässer realistischen ManganII-Konzentration, zeigt aber deutlich, **wie unempfindlich vor allem Isolat R4 auf kritische Umweltbedingungen reagiert**. Diese Unempfindlichkeit auf Umwelteinflüsse (z.B. MnII-Frachten im Wasser, Salzfrachten,

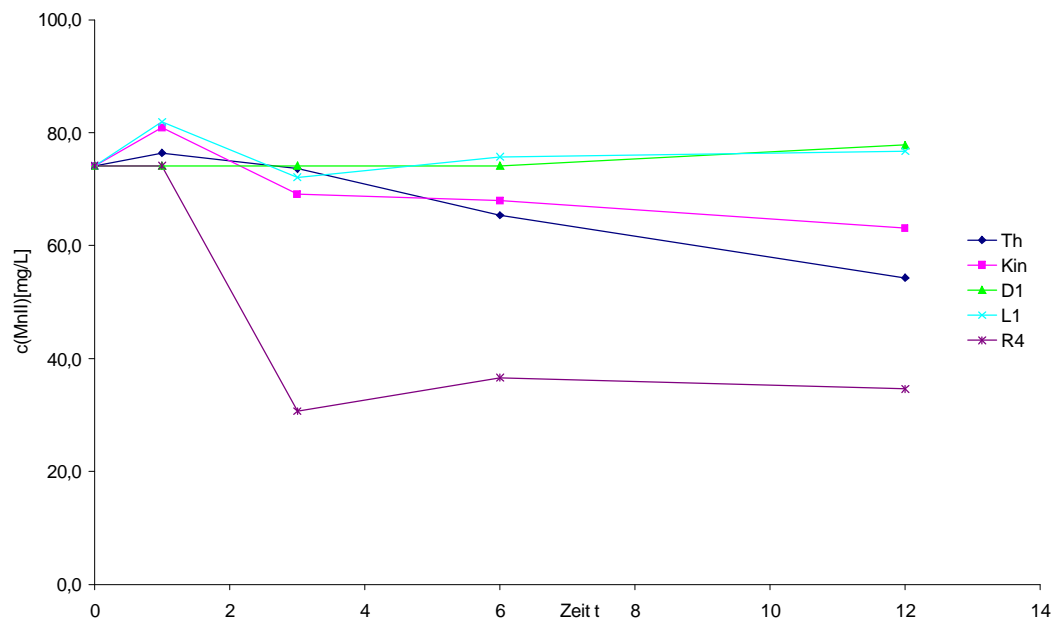


Abb. 132 Zeitlicher Verlauf der Manganoxidation der getesteten Isolate bei einer Ausgangskonzentration von 74,1 mg/L MnII. Lediglich Isolat R4 zeigt im Versuchszeitraum eine nennenswerte ManganII-Oxidation.

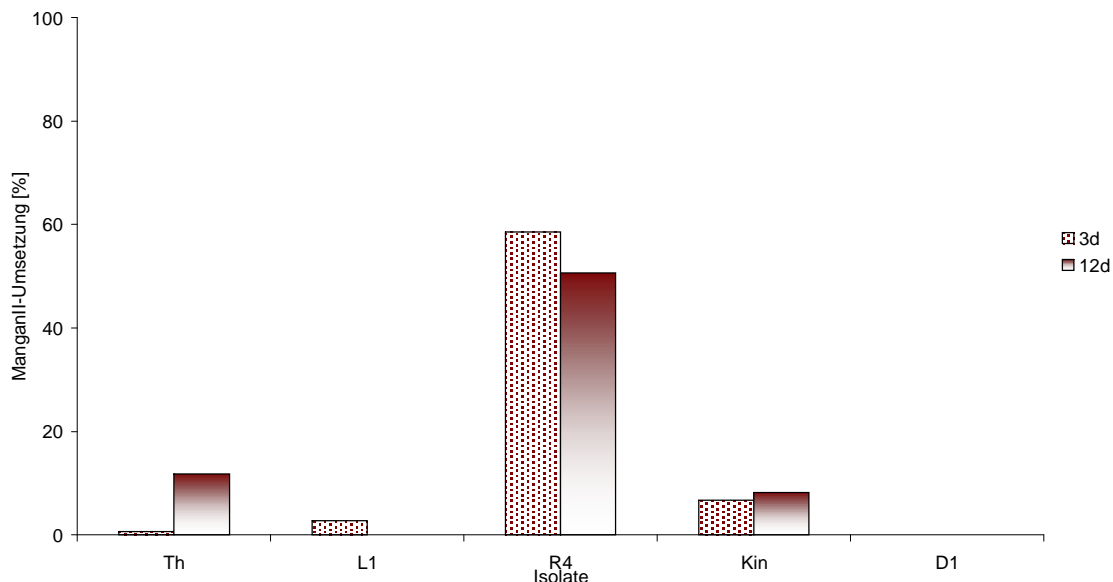


Abb. 133 Prozentuale Umsetzung von 74,1mg/L ManganII nach 24 und 72h durch die getesteten Isolate. Im Versuchszeitraum zeigt nur Isolat R4 eine nennenswerte (ca. 50%ige) Manganoxidation.

Schwermetallkonzentrationen, Kupferkonzentration) könnte vor allem Isolat R4 zu einer universell einsetzbaren Starterkultur für die ManganII-Entfernung aus Gewässern machen. Hierbei ist nicht nur an die Gewinnung und Aufbereitung von

Trink- und Mineralwässern zu denken, sondern auch an die Aufreinigung stark mangan(II)haltiger Abwässer, die etwa bei der Laugung manganhaltiger Erze anfallen. Hierfür besteht in einigen Bereichen Bedarf [ROBBINS ET AL. 1999].

Das Isolat D1 zeigt unter den gegebenen Bedingungen erneut erst nach gut 28d eine Manganoxidation im Medium mit 6,6mg/L von ca. 20%. In den Medien mit 2,9 mg/L und mit 0,4 mg/L setzt sie noch später ein (nicht dargestellte Werte).

3.9.8 Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Manganpräzipitierende Mikroorganismen gelten als in der Regel „sessil“, d.h. sie setzen sich an Oberflächen in ihrer Umwelt fest und führen dort die Manganoxidationsprozesse durch. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass zur Verfügung gestellte Oberflächen ein entscheidender Faktor für die Fähigkeit der Manganoxidation bei den untersuchten Stämmen darstellen (vgl. 3.8). Einige Stämme zeigen ohne weitere Aufwuchsflächen als die Glaswände keinerlei manganoxidierende Wirkung. **Erst durch Zugabe von 0,1% Agar zum Medium können bereits nach wenigen Tagen Manganoxidationsprozesse beobachtet werden** (vgl. 3.8). Der Einfluss fester Oberflächen kann auch Auswirkungen auf die technische Umsetzung der Entmanganung haben. Mikroorganismen, die eine Entmanganung ohne Zusatz eines Verfestigungsmittels bewerkstelligen können, könnten möglicherweise ein gröberes Kiesbett zur Entmanganung nutzen. Dies hätte einen geringeren Filtergegendruck, höhere Filtrationsgeschwindigkeiten und damit geringere Kosten zur Folge. Denkbar wäre auch eine Anzucht der Mikroorganismen auf festen Oberflächen (Kies), die dann als komplette Einheit in den Produktionsprozess eingegliedert werden könnten.

Zur Untersuchung des Einflusses fester Oberflächen auf die Manganoxidation wurden den Isolaten im flüssigen, gepufferten Basismedium verschiedene Agarkonzentrationen zur Verfügung gestellt: 0 g/L, 0,1g/L, 0,3g/L, 1g/L und 3g/L.

3.9.8.1 Isolat Th – Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Das Isolat Th (*L. discophora*) zeigt bereits nach 44h einen deutlichen Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation (vgl. Abb. 134 und 135). Während im Medium mit 3g/L Agar das ManganII bereits quantitativ aus dem Medium entfernt

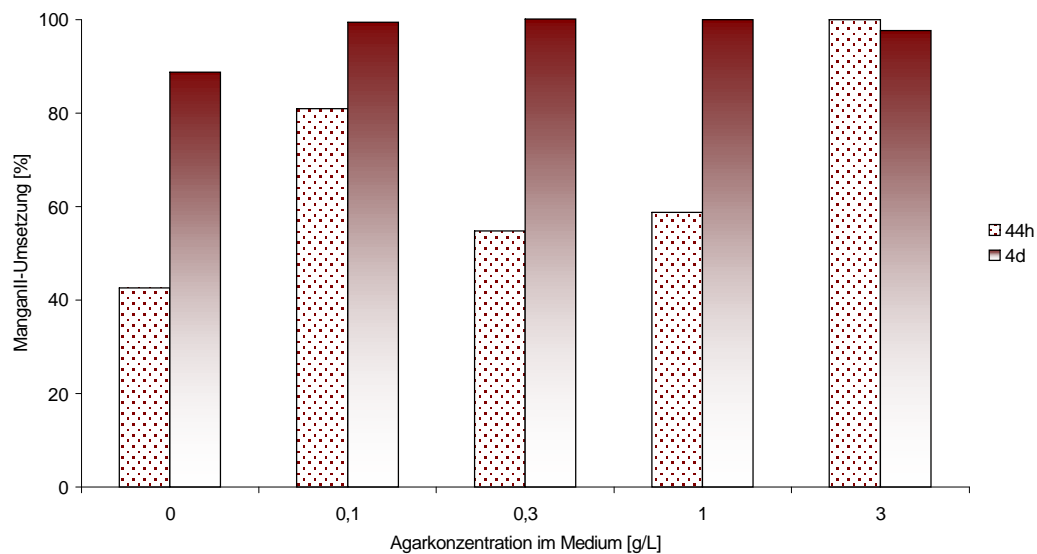


Abb. 134 Prozentuelle ManganII-Umsetzung nach 44h und nach 4d bei verschiedenen Agar-Zugaben. Die Umsetzungsrate steigt mit der Zunahme der Agarkonzentration im Medium.

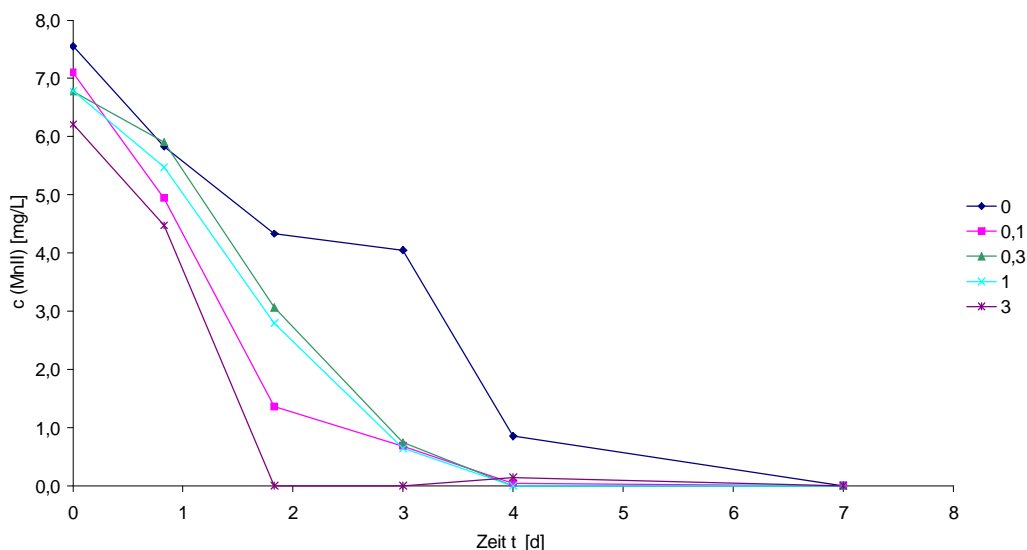


Abb. 135 Zeitlicher Verlauf der ManganII-Umsetzung durch Isolat Th. Bereits nach weniger als zwei Tagen ist das ManganII nach Zugabe von 3g/L Agar quantitativ in ManganIV umgesetzt.

ist, zeigen die Ansätze mit den geringeren Agarkonzentrationen geringere Umsetzungsraten: 1 g/L Agar 59%, 0,3 g/L 54%, 0,1 g/L 80% und 0 g/L Agar: 43%. Die Fähigkeit von *L. discophora* zur Manganoxidation kann durch **Aufwuchsflächen deutlich positiv** (zum Zeitpunkt 44h) beeinflusst werden. Auch hier ist eine pH-Verschiebung nicht ursächlich für die Manganoxidation (nicht dargestellt).

Es wird auch deutlich, dass die Manganoxidation im agarfreien Medium nicht ausbleibt, sondern lediglich leicht verzögert auftritt. Ein Einsatz als Starterkultur mit verringerten Oberflächen, d.h. größeren Filtermaterial ist daher durchaus denkbar.

3.9.8.2 Isolat L1 – Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Auch bei Isolat L1 ist das ManganII bei 3g/L Agarkonzentration bereits nach 44h quantitativ aus dem Medium entfernt. Die Kurvenverläufe ähneln denen des Isolats Th (Abb. 136 und 137). Nur bei Agarkonzentrationen von 1g/L und mehr erfolgt eine quantitative MnII-Entfernung im Versuchszeitraum aus dem Medium. Mit weniger Agar im Medium werden nicht mehr als 60% des ManganII umgesetzt. Das geringere Angebot an Aufwuchsflächen führt also offenbar zu einer geringeren

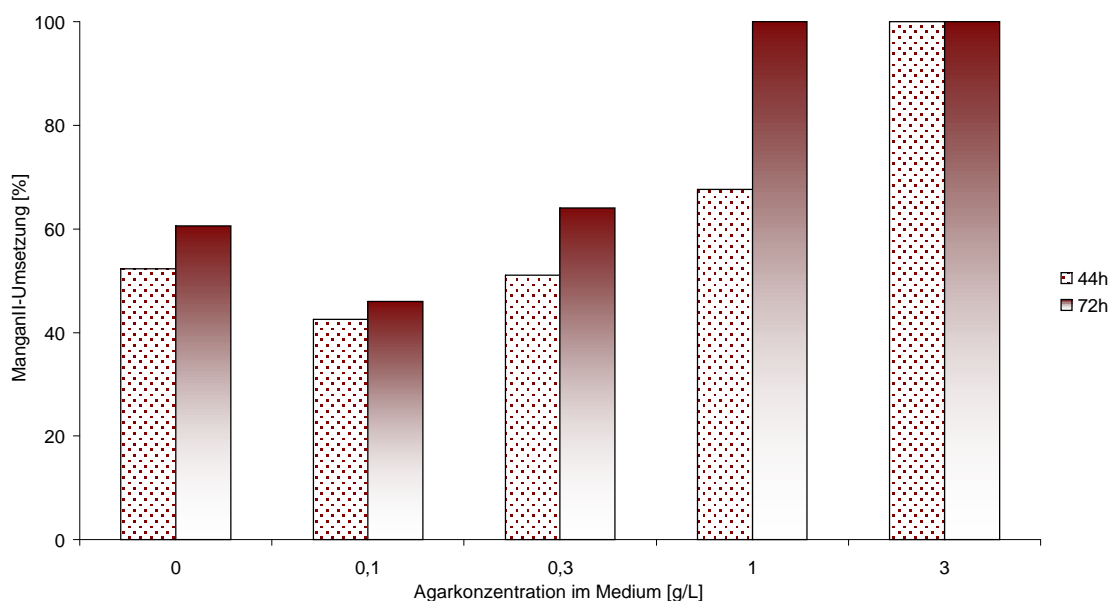


Abb. 136 Isolat L1 - Umsetzungsrate MnII->MnIV nach 44h und nach 72h bei steigenden Agar-Zugaben. Die Umsetzungsrate steigt mit der Zunahme der Agarkonzentration im Medium.

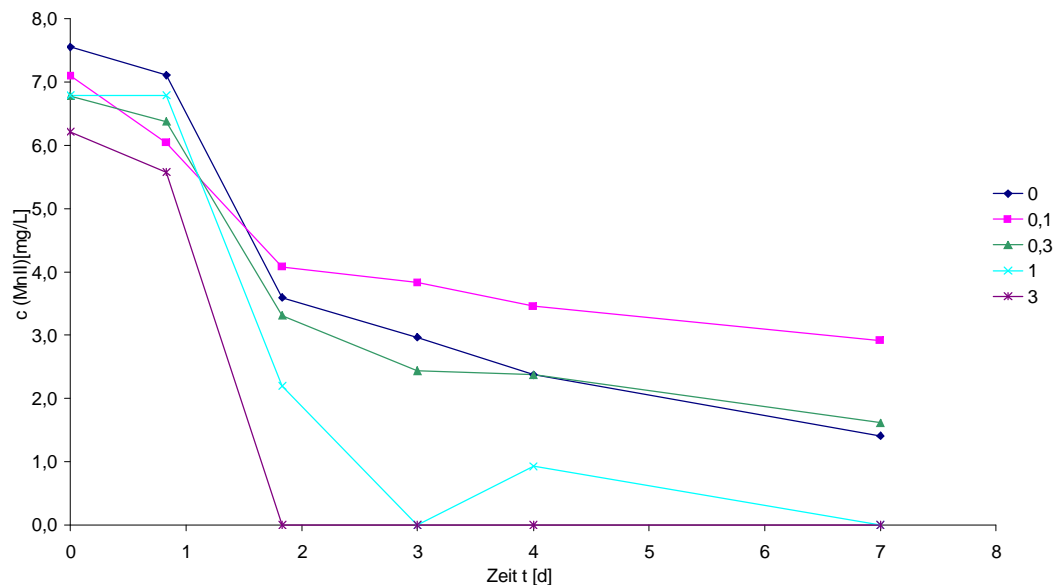


Abb. 137 Isolat L1 - Zeitlicher Verlauf der ManganII-Umsetzung. Bereits nach 44h ist bei einer Agarzugabe von 3g/L das ManganII quantitativ in ManganIV umgesetzt.

Ausbildung von Haftscheiben, die die Orte der Manganoxidation darstellen. Dennoch ist auch Isolat L1 ohne Bereitstellung von Aufwuchsflächen in der Lage, das ManganII quantitativ aus dem Medium zu entfernen. Ein Einsatz als Starterkultur mit größerem Kies ist also auch hier denkbar. Im mikroskopischen Bild (Abb. 138-139) wird deutlich, wo die Manganoxidation beim Isolat L1 ansetzt. Anders als beim Isolat Th, wo die Manganoxidation vornehmlich am Scheidenmaterial lokalisiert ist, konzentrieren sich die Umsetzungen zu ManganIV hier auf Haftscheiben (durch Pfeile markiert).

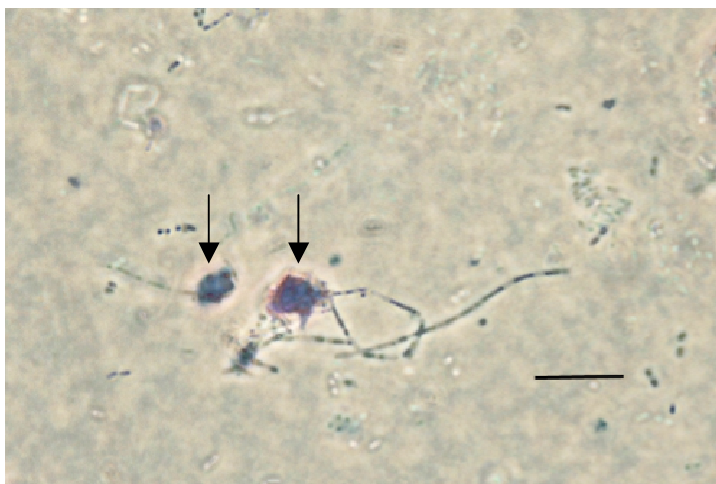


Abb. 138 Isolat L1 mit ausgebildeten Haftscheiben - mit Benzidinlösung angefärbt (Balken = 10μm)



Abb. 139 Isolat L1 - Ausbildung von Haftscheiben durch Isolat L1 (Balken = 10µm) – ungefärbtes Präparat

3.9.8.3 Isolat R4 - Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Isolat R4 zeigt bei den gewählten Konditionen nur **wenig Einfluss der Agarkonzentration** auf die Manganoxidation. Nach 44h sind alle Ansätze

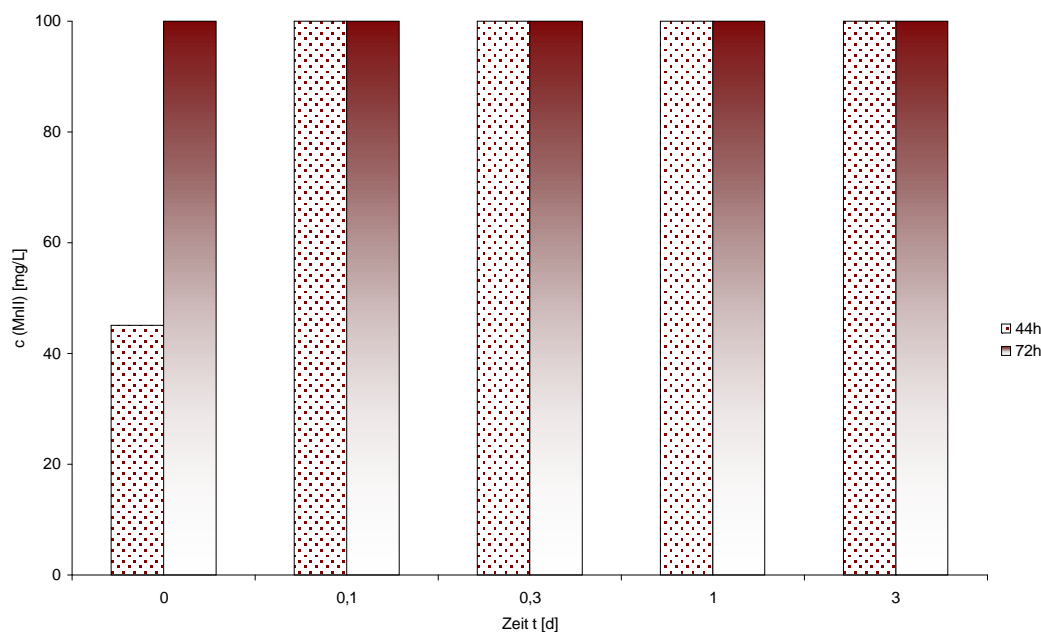


Abb. 140 Isolat R4 - Umsatzrate MnII->MnIV nach 44h bei Isolat R4 bei verschiedenen Agarkonzentrationen. Nur der im agarfreien Ansatz ist das MnII nach 44h noch nicht quantitativ zu MnIV umgesetzt. Doch auch der agarfreie Ansatz zeigt nach nur 72 h eine vollständige ManganII-Entfernung aus dem Medium.

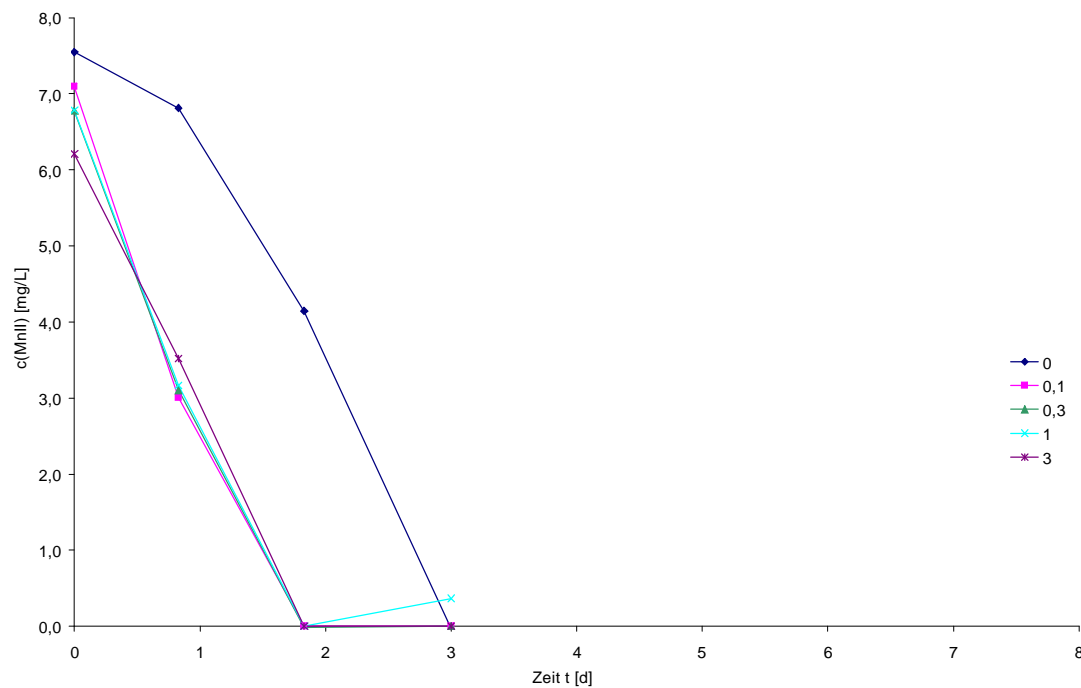


Abb. 141 Isolat R4 - Zeitlicher Verlauf der Manganumsetzung bei Isolat R4. Nach 44h sind vier von fünf Ansätzen manganII-frei, nach 72h auch der agarfreie Ansatz.

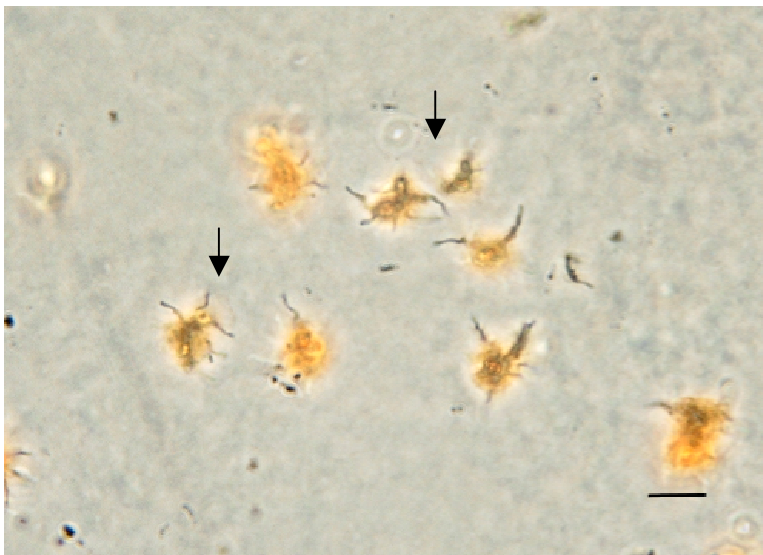


Abb. 142 Ausbildung von sternförmigen, verockerten Zell-Anordnungen durch Isolat R4 als Phasenkontrastaufnahme (Balken = 10μm)

manganII-frei (vgl. Abb. 140-141). Lediglich der agarfreie Ansatz zeigt eine ManganII-Umsetzung von nur knapp 50%.

Obgleich ebenso wie bei Isolat L1 hauptsächlich Haftscheiben für die Manganoxidation verantwortlich sind (vgl. Abb. 142-143), ist der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation eher von sekundärer Bedeutung. Dies

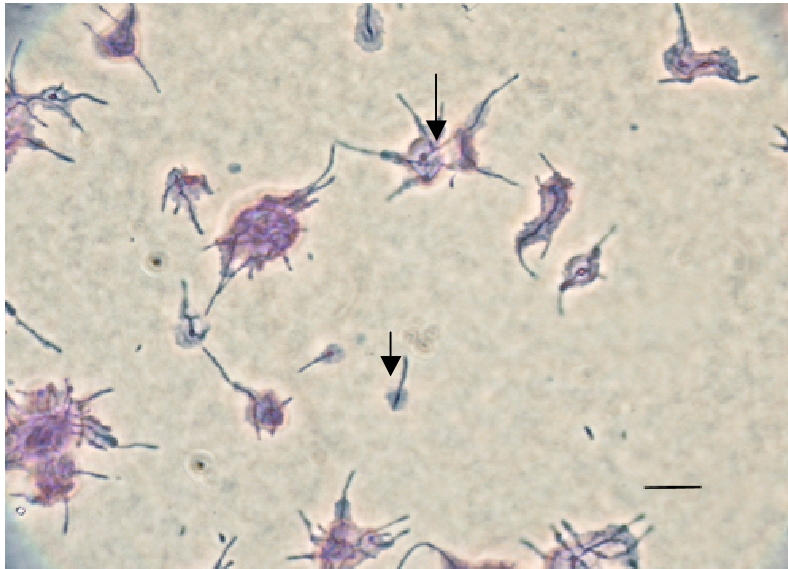


Abb. 143 Isolat R4 - Färbung des verockerten Scheidenmaterials mit Benzidin-Lösung. Die Scheiden und Haftscheiben, sowie die eingelagerten Zellfäden sind deutlich erkennbar; Phasenkontrastaufnahme (Balken = 10µm)

liegt vor allem an der räumlich wesentlich größeren Ausdehnung der Haftscheiben, die zusätzlich noch von Scheidenmaterial ergänzt werden.

3.9.8.4 Isolat KIN- Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Isolat KIN zeigt vergleichbar wenig Einflüsse auf die Manganoxidation durch variierte Agarkonzentrationen. Bereits nach 44h sind alle Medien manganII-frei (vgl. Abb. 144 und Abb. 145). Isolat KIN scheint ähnlich unempfindlich gegen größere oder geringere Agarkonzentrationen zu sein, wie Isolat R4. Es ist daher nicht mit negativen Einflüssen durch evtl. fehlende Aufwuchsflächen zu rechnen.

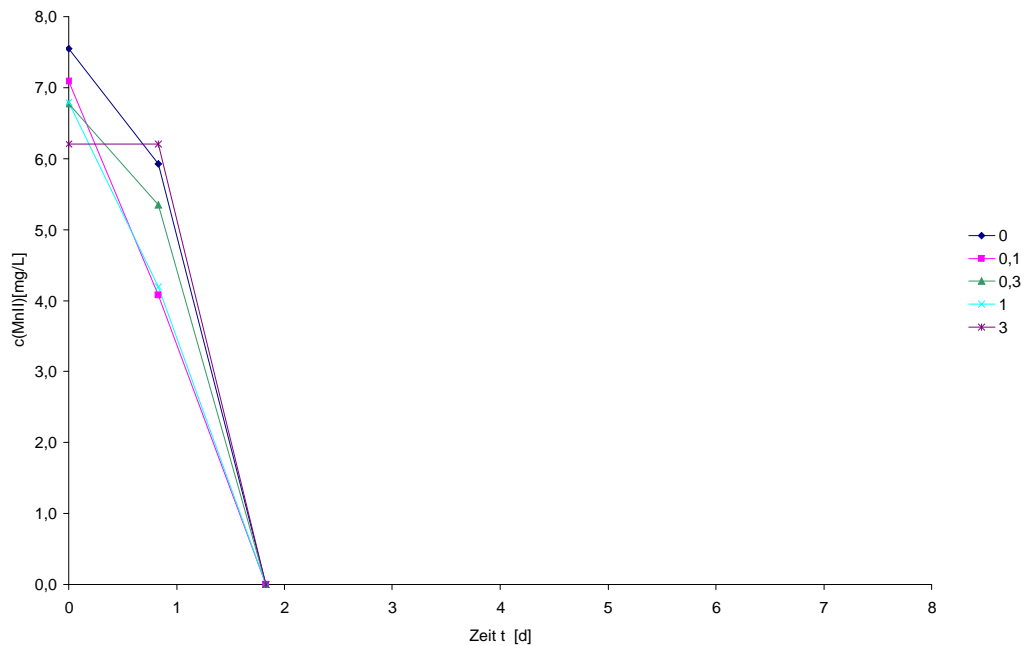


Abb. 144 Isolat KIN - Zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Agarkonzentration im Medium. Isolat KIN zeigt keine signifikanten Einflüsse durch die Zugabe von Agar.

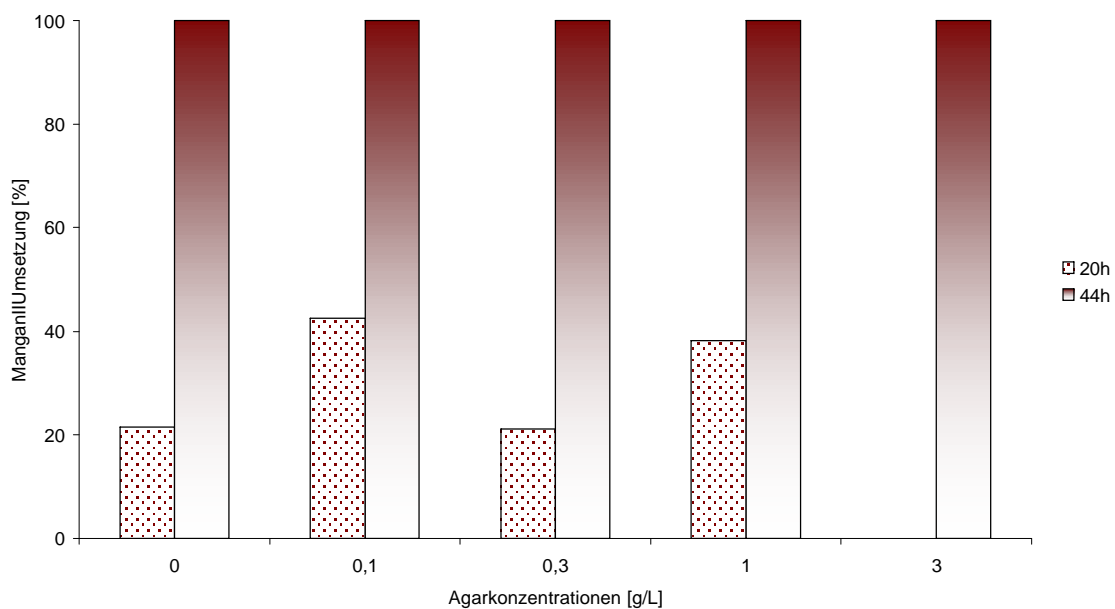


Abb. 145 Isolat KIN - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 20h und nach 44h. Nach 44h findet in allen Medien eine quantitative Umsetzung des gelösten MnII zu MnIV statt.

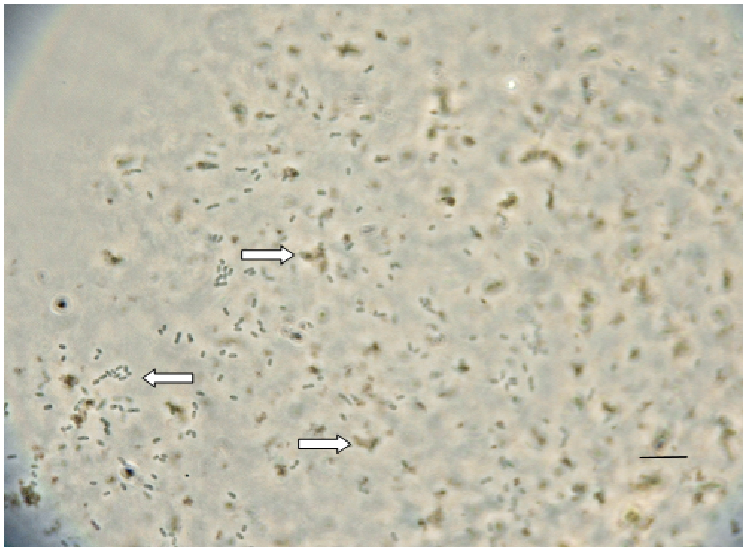


Abb. 146 Isolat KIN - Phasenkontrastaufnahme nach 44h Inkubation (Balken = 10µm)

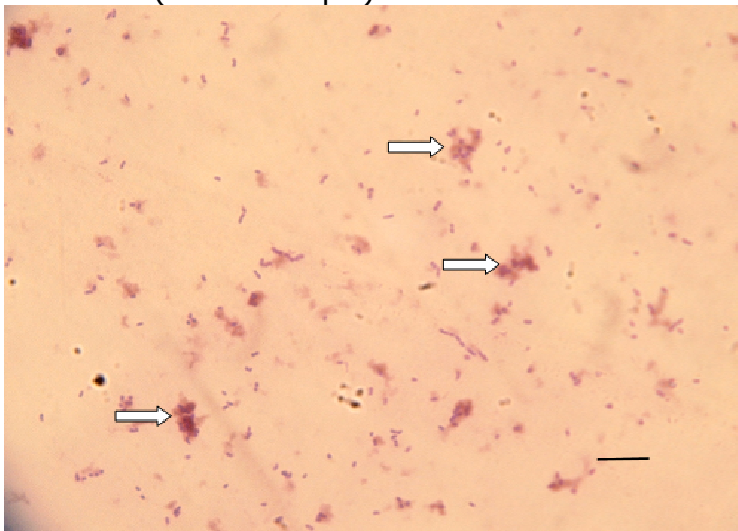


Abb. 147 Isolat KIN - Kristallviolettgefärbung ebenfalls nach 44h Inkubation (Balken = 10µm)

3.9.8.5 Isolat D1-Der Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation

Die deutlichsten Einflüsse höherer Agarkonzentrationen auf die Manganoxidation im Medium zeigt Isolat D1. Während bei anderen Versuchsansätzen (vgl. Nr. 3.9.5.1 – 3.9.6.5) die Manganoxidation oft erst nach sechs Wochen oder mehr einsetzt, ist hier bei 3g/L Agar bereits nach 15d eine Manganoxidation von ca. 40% zu verzeichnen. Nach 47d ist die Manganoxidation

quantitativ erfolgt. Mit nur 1g/L Agar liegen die prozentualen Umsetzungsraten mit 25% und 40% deutlich geringer, alle anderen

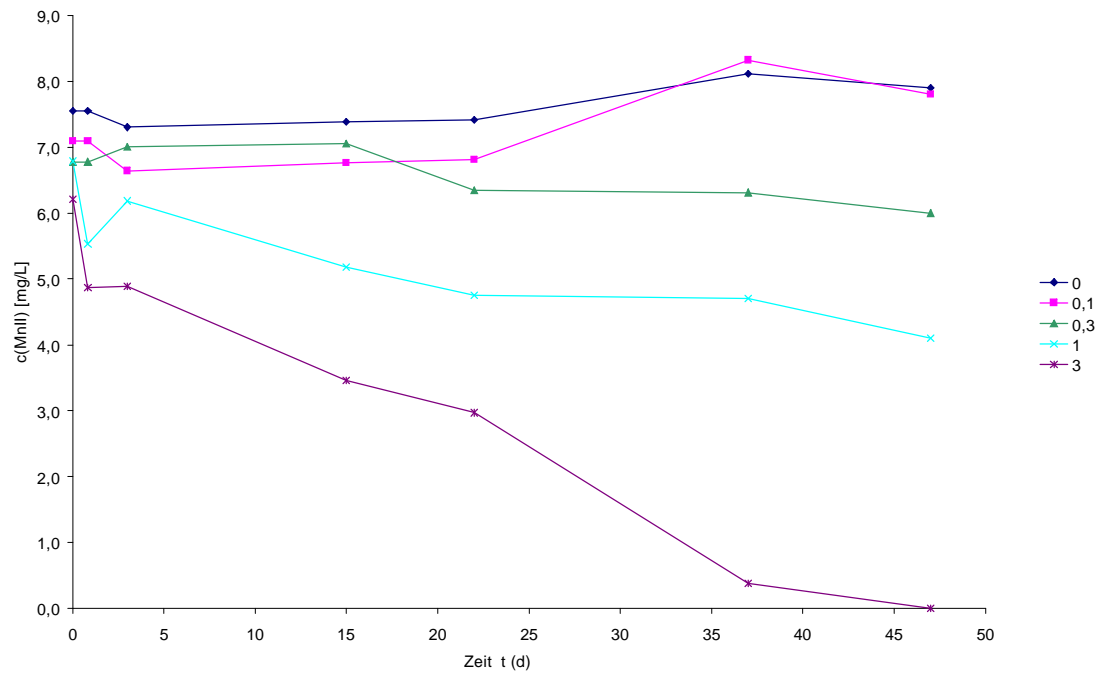


Abb. 148 Isolat D1 - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Agarkonzentration. Im Versuchszeitraum wird nur in dem Medium mit 3g/L Agar das MnII quantitativ zu MnIV oxidiert.

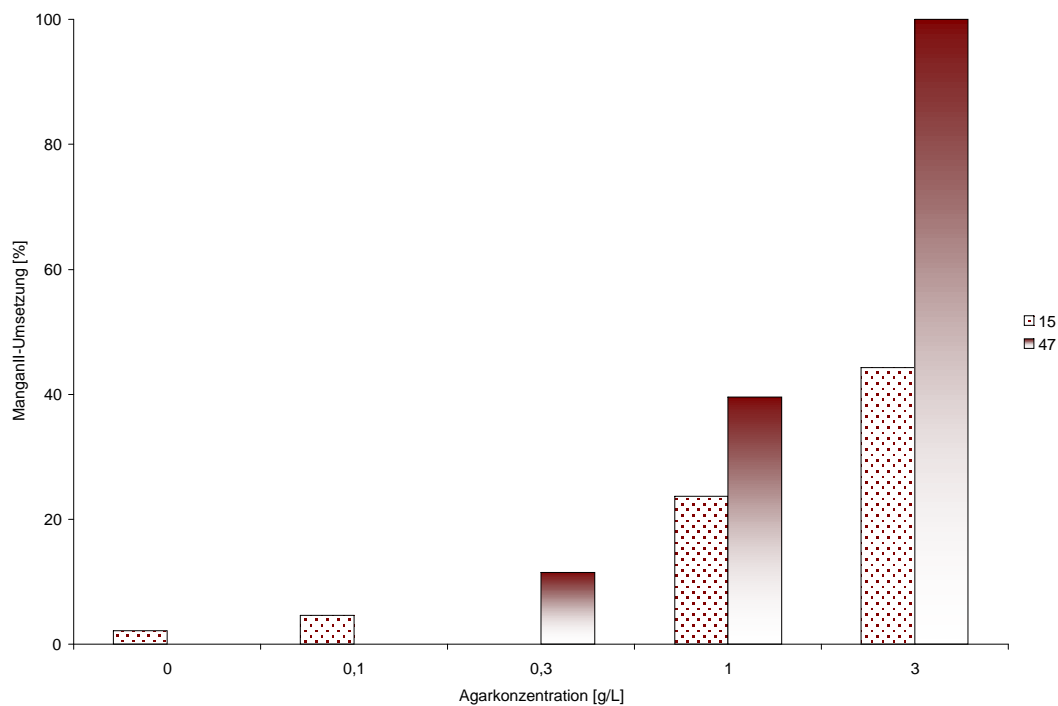


Abb. 149 Isolat D1- prozentuale ManganII-Umsetzung nach 15d und nach 47d. Die Manganoxidation nimmt deutlich mit steigender Agarkonzentration im Medium zu.

Stufen zeigen keine signifikante ManganII-Entfernung aus dem Medium (vgl. Abb. 148-149). Dies zeigt erneut, das Isolat D1 sehr spezifische Bedingungen benötigt, um eine effektive Manganoxidation durchführen zu können. Sind alle diese Parameter (Organikgehalt, pH-Wert, Agarkonzentration,...) optimal gewählt, kann es durch Isolat D1 zu einer schnellen Manganoxidation kommen, dennoch scheint ein derart spezialisierter Organismus als Starterkultur für die Entmanganung ungeeignet, da es unmöglich sein wird, optimale Bedingungen für Isolat D1 konstant über einen langen Zeitraum gesetzeskonform einzustellen.

Die Manganoxidation verläuft bei allen untersuchten Isolaten besser, je mehr Agar als Aufwuchsfläche den beteiligten Mikroorganismen zur Verfügung steht. Dies wird bei Isolat D1 am deutlichsten, wo im Medium mit 3g/L Agar das ManganII quantitativ zu ManganIV umgesetzt wird. Auch die Isolate Th und L1 zeigen tendenziell eine verbesserte Manganoxidation durch vermehrte Aufwuchsflächen. Die Isolate KIN und R4 zeigen erneut, dass ihr Oxidationsfenster sehr breit ist.

3.9.9 Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas

Die Untersuchungen unter 3.9.8 haben eindeutig gezeigt, dass das Verfestigungsmittel Agar einen positiven Effekt auf die Manganoxidation haben kann. Die Ergebnisse aus dem Vorversuch (3.8) wurden damit bestätigt. Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse des Verfestigungsmittels Agar auch auf andere verfestigende Mittel und damit Oberflächen übertragen lassen, wurde Wasserglas als weiteres Verfestigungsmittel getestet.

Genutzt wurde Natronwasserglas. Zur Untersuchung wurde das flüssige, gepufferte Basismedium mit verschiedenen Wasserglaskonzentrationen angesetzt (zur Herstellung von wasserglasverfestigten Medien siehe Bast [BAST 1999]). Dabei ist

festzustellen, dass mit zunehmender Wasserglaskonzentration die messbare MnII-Konzentration im Medium trotz identischer Ausgangskonzentrationen, geringer wird. Dies liegt höchstwahrscheinlich an der Bildung von unlöslichen Hydrogensilikaten nach den allgemeinen Formeln: M_3HSiO_4 , $M_2H_2SiO_4$ oder MH_3SiO_4 (mit M= einwertiges Metallkation) [FALBE/REGITZ 1992]. Die angegebenen prozentualen Werte für die Wasserglaskonzentration beziehen sich auf die zugegebene Mengen im Verhältnis zum Festmedium (bei Stufe 1% wurden somit 1% der für ein Festmedium benötigten Menge Kieselgel zugefügt).

3.9.9.1 Isolat Th - Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas

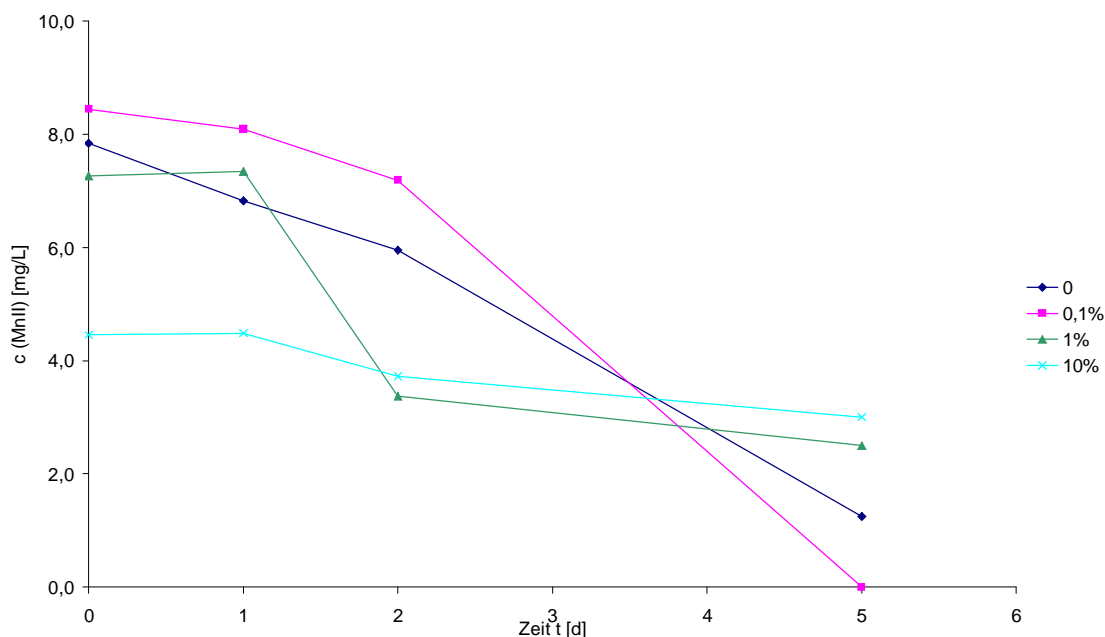


Abb. 150 Isolat Th - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit vom Gehalt an Wasserglas im Medium. Die Manganoxidation bei Isolat Th verläuft deutlich besser bei niedrigen Gehalten des Verfestigungsmittels.

Für Isolat Th zeigt sich ein leicht positiver Effekt durch die Zugabe von Wasserglas ins Medium (Stufe 1) (vgl. Abb. 150-151). Es wird deutlich, dass bei weiterer **Zunahme der Wasserglaskonzentration die Manganoxidation zunehmend gehemmt wird**. Der positive Effekt der Wasserglaszugabe ist also auf geringste Dosierungen beschränkt. Nach 2d ist das MnII aus Medium 0,1% zu ca. 50% eliminiert, aus den anderen Medien zu ca. 20%. Nach 5d ist der Wert in Medium 1%

nur auf ca. 65% angestiegen, während die Medien ohne, oder nur mit geringer Wasserglaskonzentration zu 85% bzw. zu 100% manganII-frei sind.

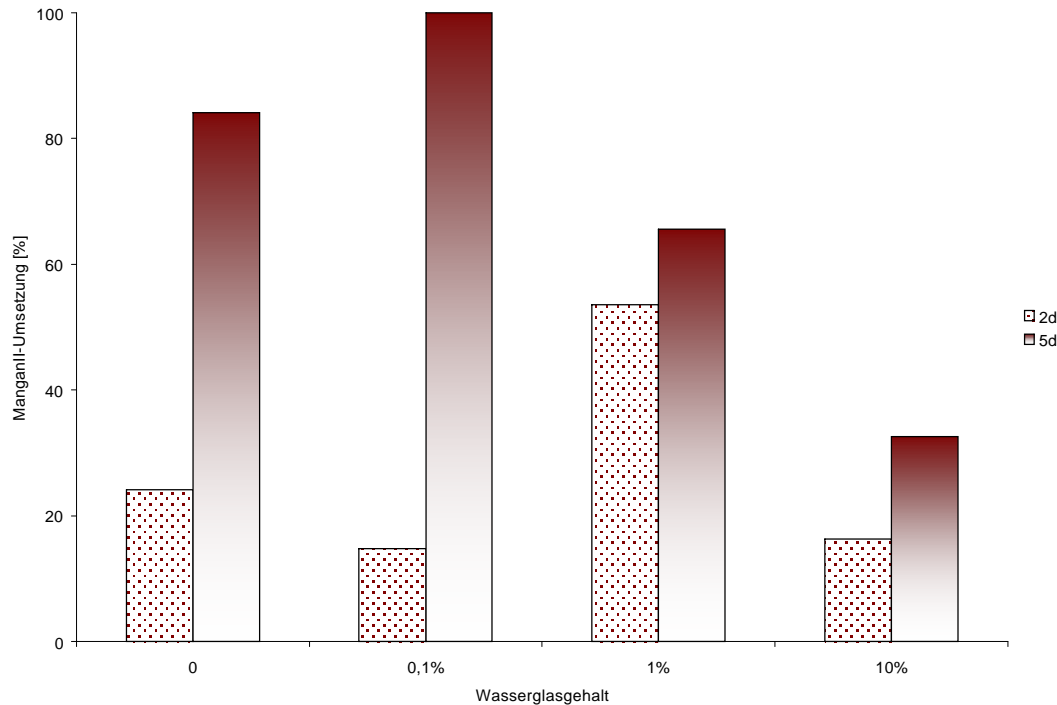


Abb. 151 Isolat Th - prozentuale ManganII-Umsetzung in Abhängigkeit von der Wasserglaskonzentration im Medium.

3.9.9.2 Isolat L1 - Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas

Bei Isolat L1 zeigt sich erneut ein signifikanter Unterschied zur scheidenbildenden Variante von *Leptothrix discophora*. Isolat L1 zeigt eine Hemmung der Manganoxidation durch eine Wasserglaszugabe. Nur im wasserglasfreien Medium "0%" zeigt sich die zu erwartende Manganoxidation. Der gravierende Unterschied zwischen diesen Isolaten - die Scheidenbildung – befähigt offenbar das Isolat Th zur Manganoxidation, während beim Isolat L1 die **Manganoxidation über die Haftscheiben durch das Wasserglas gehemmt wird.**

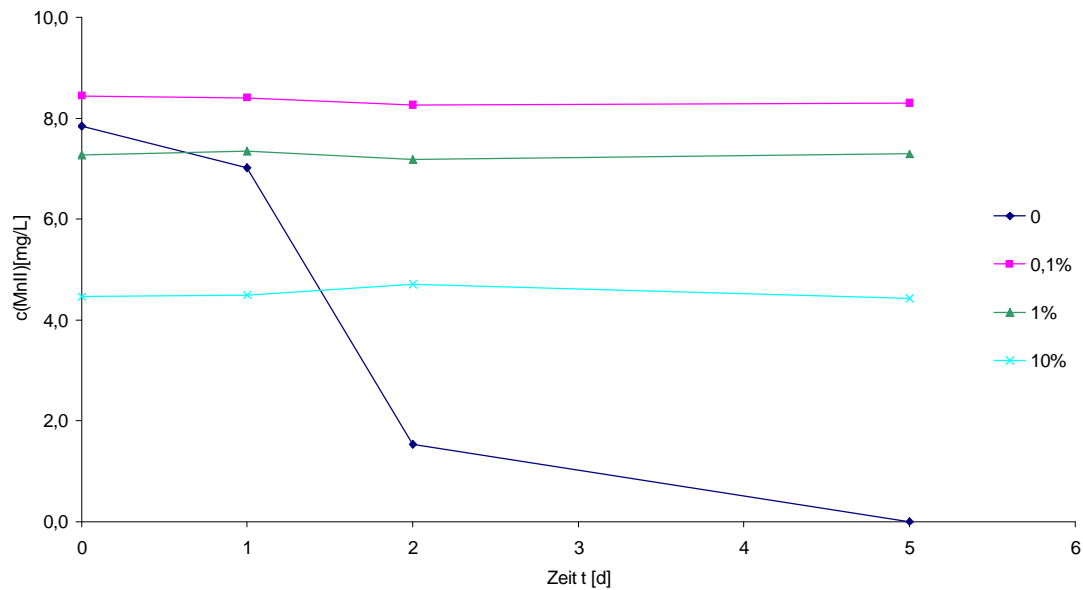


Abb. 152 Isolat L1 - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Konzentration des Verfestigungsmittels Wasserglas im Medium. Schon bei geringer Zugabe von Wasserglas ins Medium findet praktisch keine Manganoxidation mehr statt.

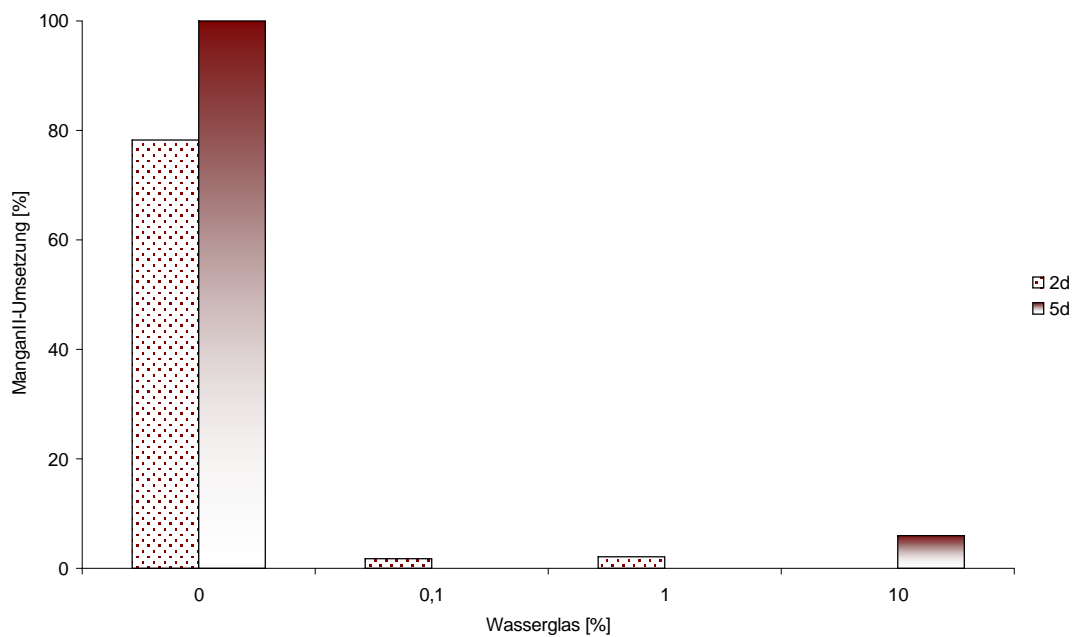


Abb. 153 Isolat L1- prozentuale ManganII-Umsetzung in Abhängigkeit von der Wasserglaskonzentration im Medium. Schon bei geringer Zugabe von Wasserglas ins Medium findet praktisch keine Manganoxidation mehr statt.

3.9.9.3 Isolate R4, KIN und D1- Die Beeinflussung der Manganoxidation durch das Verfestigungsmittel Wasserglas

Die Isolate R4, KIN und D1 zeigen eine ähnliche Charakteristik hinsichtlich der Beeinflussung der Manganoxidation durch die Wasserglaszugabe ins Medium. Durch die Zugabe des Verfestigungsmittels wird bei allen drei Isolaten die Manganoxidation vollständig unterbunden (vgl. Abb. 154-157). Der pH-Wert spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Trotz der diffizilen Einstellung blieb er in allen Medien im eingestellten Bereich konstant. Deutlich wird aber, dass die positiven Effekte des Verfestigungsmittels Agar nicht auf andere Verfestigungsmittel und insbesondere nicht auf Wasserglas übertragbar sind. Auch hier wird die Fähigkeit der Manganoxidation unter Bedingungen deutlich, die denen der natürlichen Habitate nicht vergleichbar sind. Es wird aber auch klar, dass die scheidengebundene Manganoxidation von Isolat Th deutlich unempfindlicher auf erhöhte Wasserglaskonzentrationen im Medium reagiert, als die sonstigen Oxidationssysteme. Die Ursache hierfür ist nicht geklärt, könnte aber in der Adsorption von für die Manganoxidation essentiellen Substanzen (z.B. CuII) an die Silikatoberflächen.

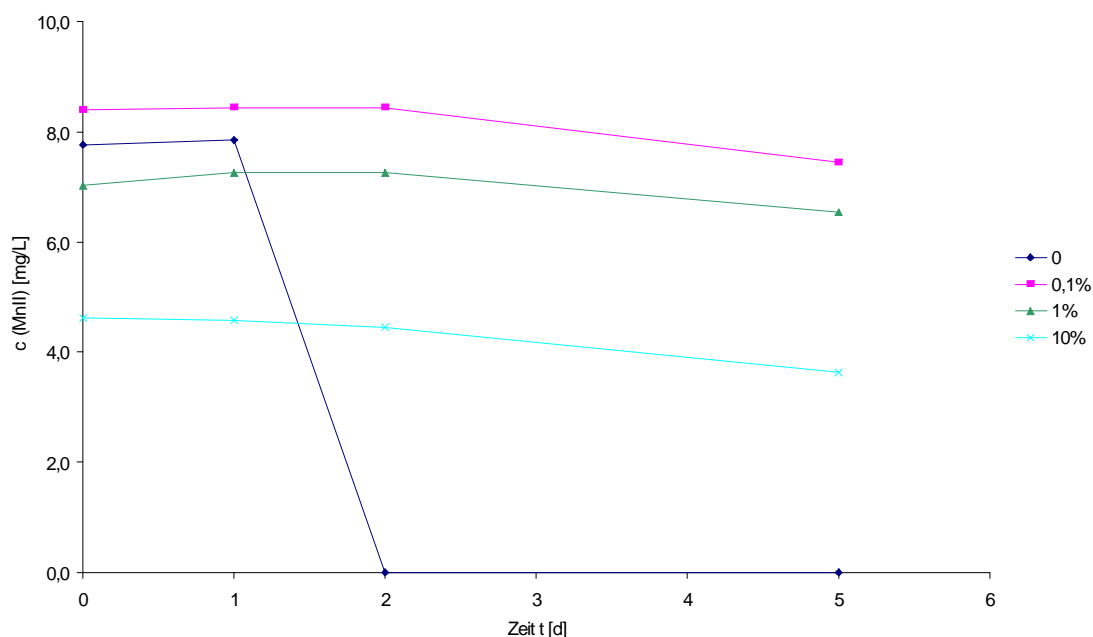


Abb. 154 Isolat R4 – zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Wasserglaskonzentration im Medium. Schon bei geringeren Wasserglaszugaben ins Medium findet im Versuchszeitraum praktisch keine Manganoxidation mehr statt

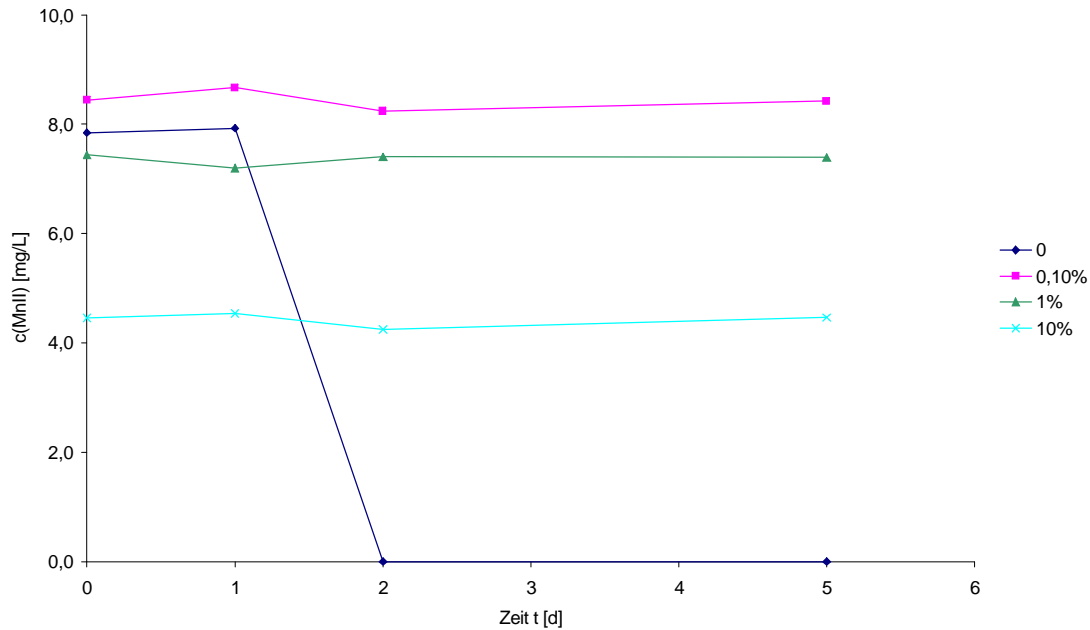


Abb. 155 Isolat KIN - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Wasserglaskonzentration im Medium. Schon bei geringeren Wasserglaszugaben ins Medium findet im Versuchszeitraum praktisch keine Manganoxidation mehr statt.

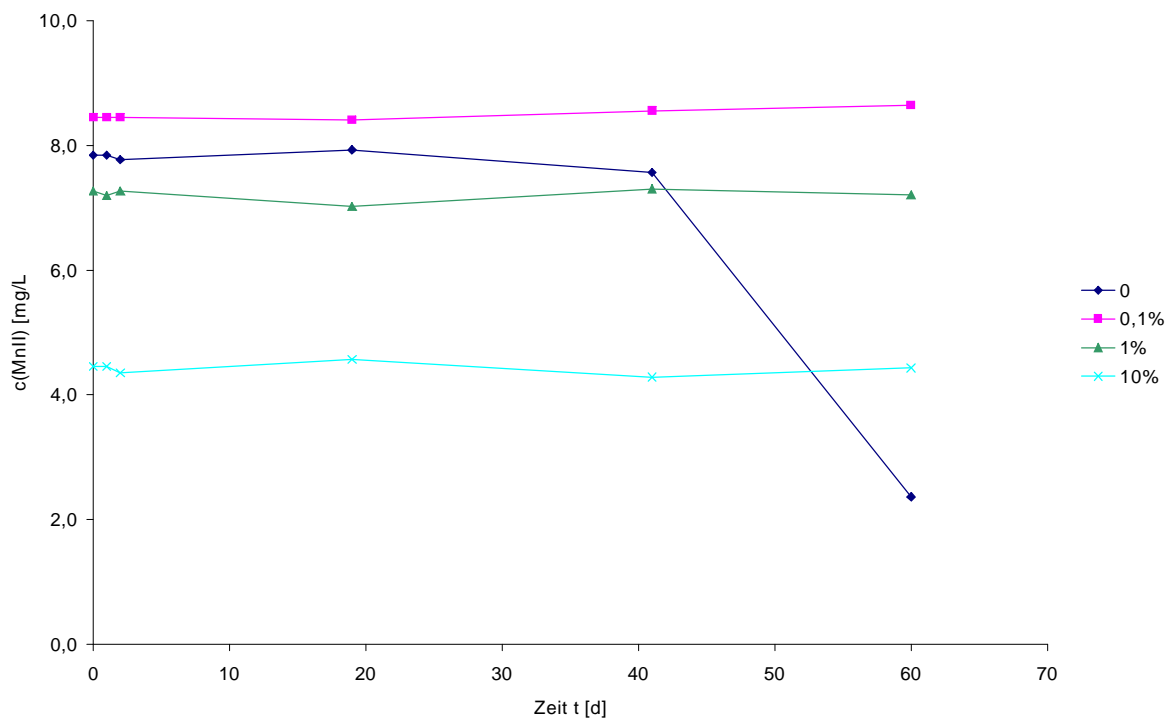


Abb. 156 Isolat D1 - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Wasserglaskonzentration im Medium. Schon bei geringeren Wasserglaszugaben ins Medium findet im Versuchszeitraum praktisch keine Manganoxidation mehr statt.

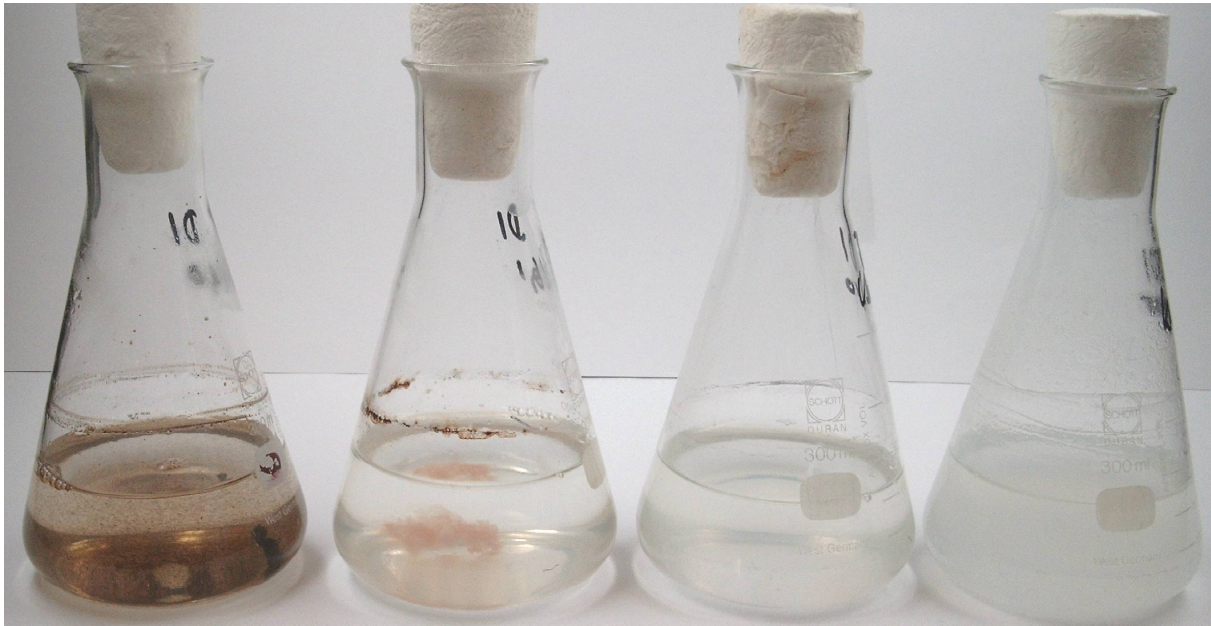


Abb. 157 Isolat D1 - Exemplarische Ansicht der Batch-Kulturen nach Zusatz von Wasserglas (Stufen v.l. 0, 1, 10 und 100). Deutliche Hemmung der Manganoxidation durch die Wasserglaszugaben (Inkubationszeit 60d).

3.9.10 Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Grundwässer werde, je nach Tiefe des Förderbrunnens mit einer Temperatur von 7-9°C gefördert. Bei speziellen geologischen Gegebenheiten oder einer großen Fördertiefe kann die Temperatur aber auch deutlich höher (bis 20°C) liegen. In der Mineralwasserproduktion wird angestrebt, die Fördertemperaturen über den Aufarbeitungszeitraum möglichst nicht zu verändern, um die Wässer ohne Manipulationen an den Verbraucher abgeben zu können (vgl. 1.3.1).

Alle bislang dargestellten physiologischen Untersuchungen sind bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt worden. Auch die Anreicherungen und Isolierungen sind bei 25°C, bei Raumtemperatur (ca. 22°C) oder bei 17°C durchgeführt worden. Okazaki [OKAZAKI ET AL. 1997] gibt für *Pseudomonas fluorescens* ein Temperaturoptimum von 35°C an, während Larsen [LARSEN ET AL. 1999] das Temperaturoptimum eines *Pedomicrobium*-Isolats mit 22°C angibt. Für Isolate von *L. discophora* werden bezüglich der Manganoxidation übereinstimmend Temperaturoptima von ca. 28°C angegeben [KINZINGER 1987 UND ADAMS ET AL. 1986]. Doch diese Temperaturen können in der Mineralwasseraufarbeitung nicht immer eingehalten, bzw.

herbeigeführt werden, da dies neben einer weiteren (unerwünschten) Manipulation auch einen immensen Energie- und Kostenaufwand darstellt.

Ein Mikroorganismus mit einem nur sehr begrenzten Temperaturbereich für die Manganoxidation, wäre als Starterkultur daher denkbar ungeeignet, auch weil jahreszeitlich bedingte Temperaturschwankungen zu einer Verschlechterung der Entmanganungsleistung führen könnten.

3.9.10.1 Isolat Th – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Isolat Th zeigt sein **Temperaturoptimum bei 17°C**. Nach 3d sind hier bereits gut 80% des ManganII zu ManganIV umgesetzt. Bei 25°C und 30°C sind es erst 60%, bei 4°C und bei 37°C sind die Umsetzungsraten noch zu vernachlässigen. Nach insgesamt neun Tagen Inkubation sind hier ca. 10-20% umgesetzt, während im

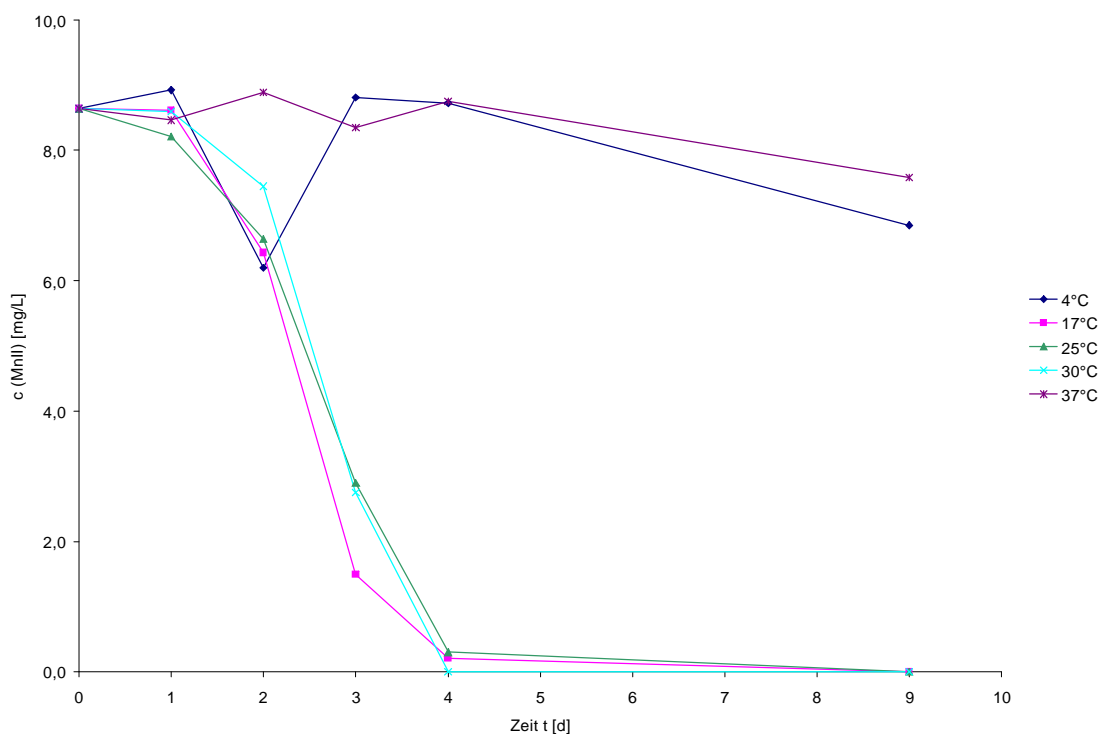


Abb. 158 Isolat Th - Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation. Der optimale Temperaturbereich liegt im Bereich zwischen 17°C und 30°C. Bei niedrigeren bzw. höheren Temperaturen tritt eine Hemmung der Manganoxidation ein.

Bereich zwischen 17°C und 30°C die Manganoxidation beendet ist. Die schnelle Manganoxidation ist also offenbar auf den mesothermen bis psychrothermen Bereich beschränkt (vgl. Abb. 158-159).

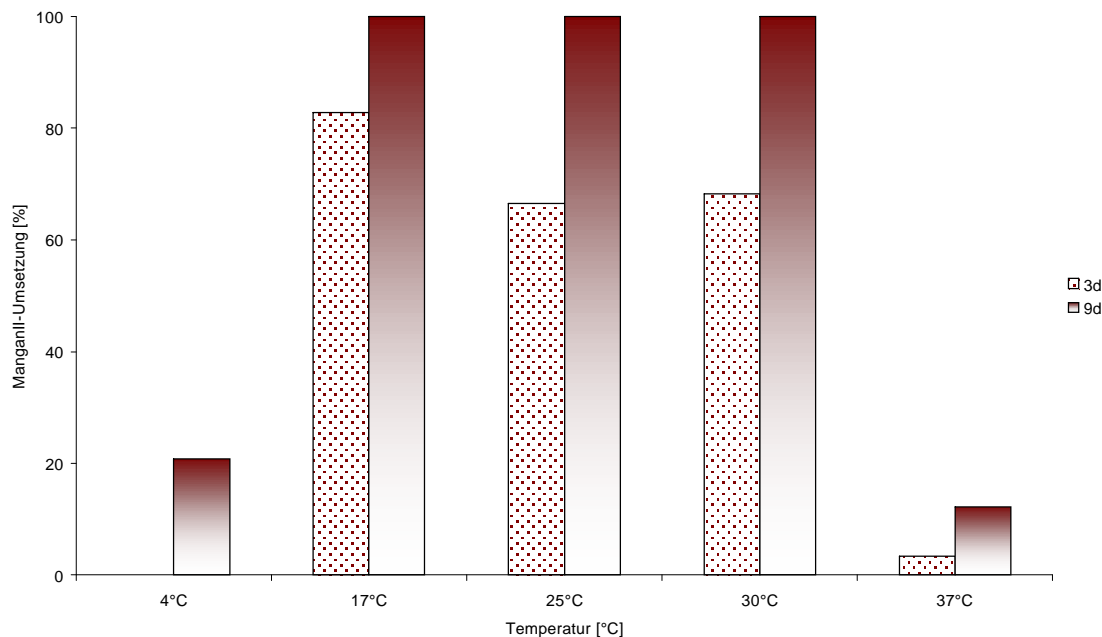


Abb. 159 Isolat Th - prozentuale ManganII-Umsetzung nach 3d und nach 9d. Das Temperaturoptimum für diesen Stamm liegt im Bereich zwischen 17°C und 30°C.

3.9.10.2 Isolat L1 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Bei Isolat L1 liegt das **Temperaturoptimum bei 25°C**. Nach 72h ist hier die Manganumsetzung beendet, bei 17°C ist sie zu ca. 90% erfolgt. Alle anderen Ansätze zeigen keine signifikante Manganoxidation (vgl. Abb. 160-161). Dies zeigt erneut, dass **die Manganoxidation durch die nicht-scheidenbildende Leptothrix discophora – Variante deutlich empfindlicher auf Umwelteinflüsse reagiert, als die Manganoxidation durch Isolat Th**. Offenbar ist die scheidengebundene Manganoxidation weniger stark von Temperaturschwankungen abhängig, und zumindest für Temperaturbereiche über 25°C eher einsetzbar. Eine Psychrotoleranz bezüglich der Manganoxidation ist bei beiden L.discophora-Varianten nicht festzustellen.

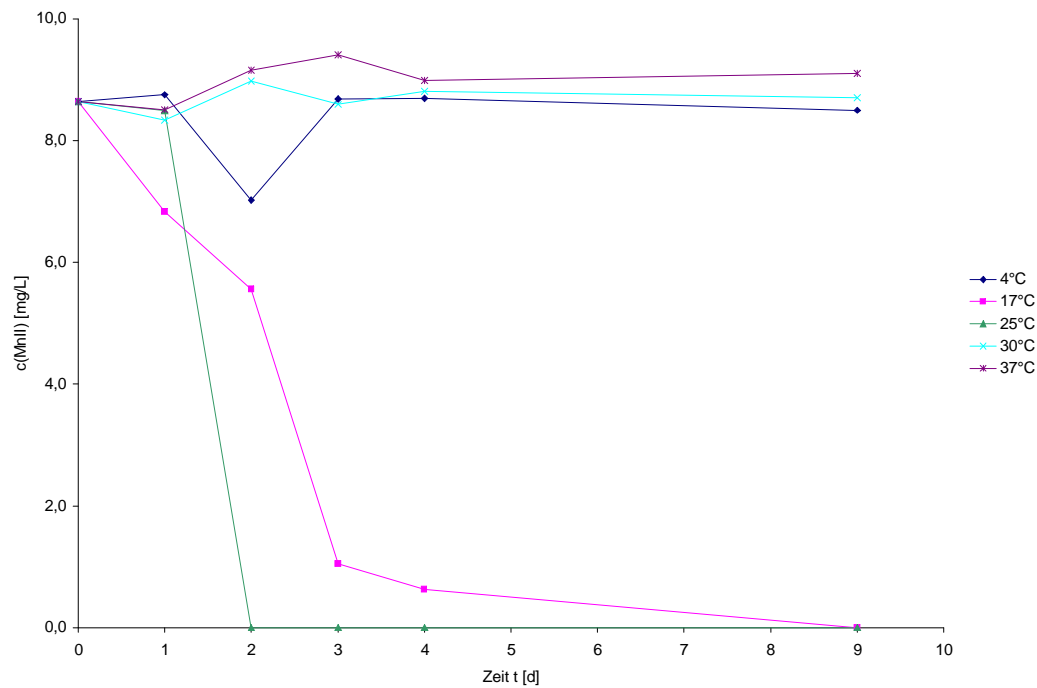


Abb. 160 Isolat L1 - Zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Temperatur – Die Manganoxidation bleibt beschränkt auf den Temperaturbereich 17°C bis 25°C.

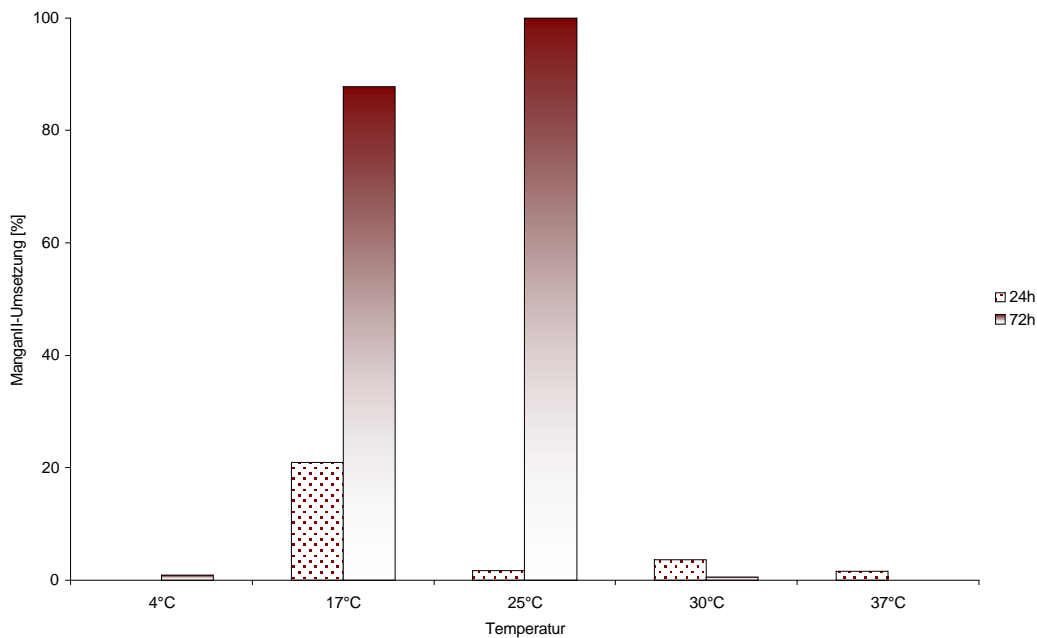


Abb. 161 Isolat L1 – prozentuale ManganII-Umsetzung in Abhängigkeit von der Temperatur. Eine quantitative MnII-Umsetzung findet lediglich im Bereich 17°C und 25°C statt.

3.9.10.3 Isolat R4 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Die Temperaturabhängigkeit der Manganoxidation durch Isolat R4 ist deutlich schwächer ausgeprägt, als bei Isolat L1. Bereits nach 48h sind in den Medien, die bei 25°C oder darüber inkubiert worden sind, die Manganumsetzungen quantitativ erfolgt (vgl. Abb. 162). Das Medium bei 17°C zeigt eine über 60%ige Eliminierung des MnII, die nach weiteren 2d vervollständigt ist. Auch bei 4°C setzt eine Manganoxidation ein, die nach 9d bereits ca. 30% des eingesetzten ManganII aus dem Medium entfernt hat. **Die Manganoxidation des Isolats R4 deckt also nicht nur den mesothermen Bereich ab. Es ist auch eine Psychrotoleranz bezüglich der Manganoxidation erkennbar.** Dies kann beim technischen Einsatz als Starterkultur in Wässern mit Temperaturen deutlich unterhalb des mesothermen Bereichs von Vorteil sein.

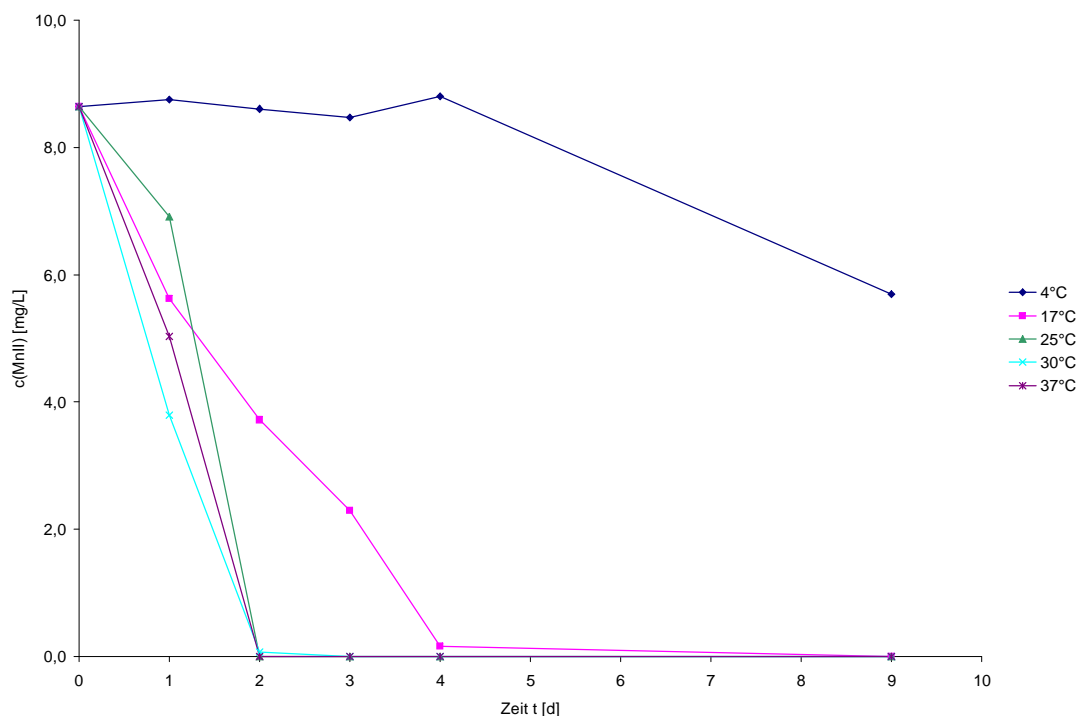


Abb. 162 Isolat R4 - Zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Temperatur. Eine Deutliche Verzögerung der Manganoxidation tritt lediglich bei tiefen Temperaturen (4°C) ein. Bis zu einer Temperatur von 37°C tritt in der Wärme kein negativer Einfluss auf die Manganoxidation ein.

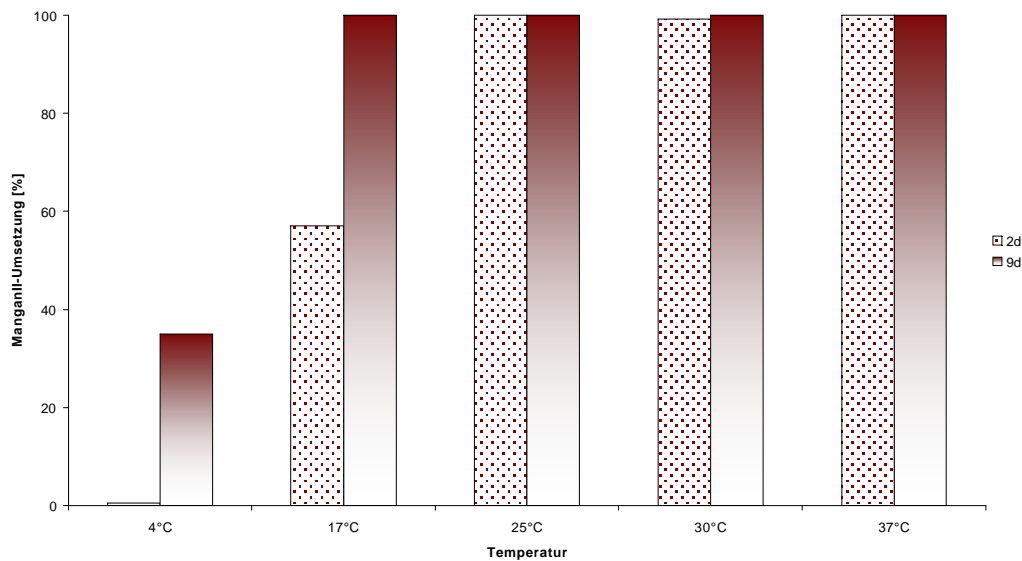


Abb. 162a Isolat R4 – prozentuale ManganII-Umsetzung in Abhängigkeit von der Temperatur.

3.9.10.4 Isolat KIN – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Die Manganoxidation von Isolat KIN erstreckt sich, wie die der *Leptotrix discophora*-Arten auch, fast ausschließlich auf den mesothermen Bereich, wobei das

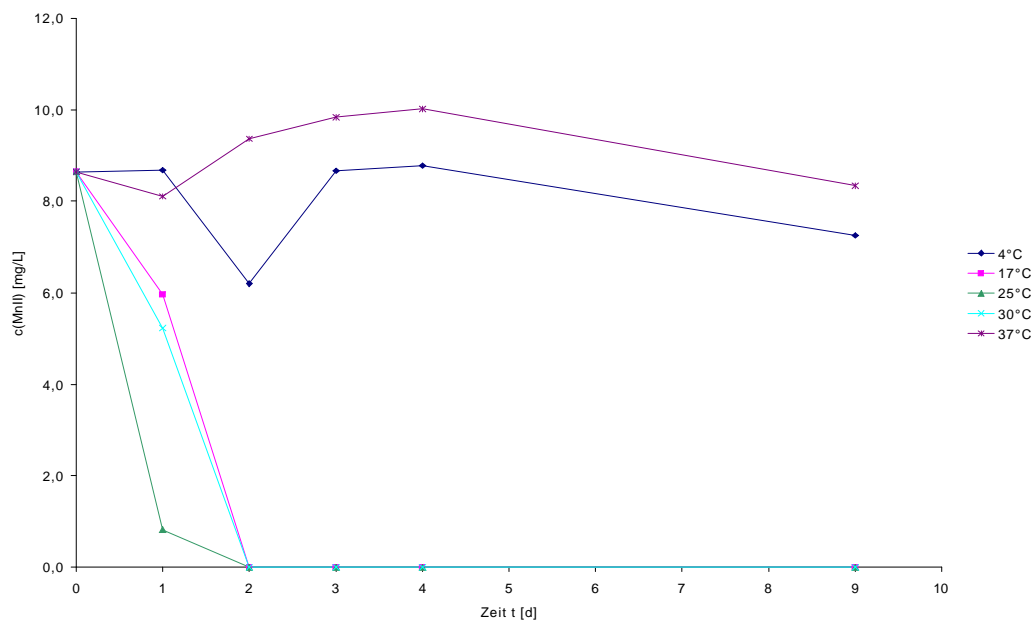


Abb. 163 Isolat KIN - zeitlicher Verlauf der Manganoxidation in Abhängigkeit von der Temperatur

Temperaturoptimum bei 25°C liegt. Bei dieser Temperatur sind bereits nach 24h über 90% des ManganII zu ManganIV oxidiert. Bei 17°C und bei 30°C sind dies erst ca. 30-35%. Nach 48h ist in diesen Temperaturbereichen kein ManganII mehr nachweisbar. In den Medien, die bei 4°C und bei 37°C inkubiert wurden, ist bis zum Versuchsende nach 9d nur eine zu vernachlässigende Manganoxidation festzustellen (vgl. Abb. 163-164).

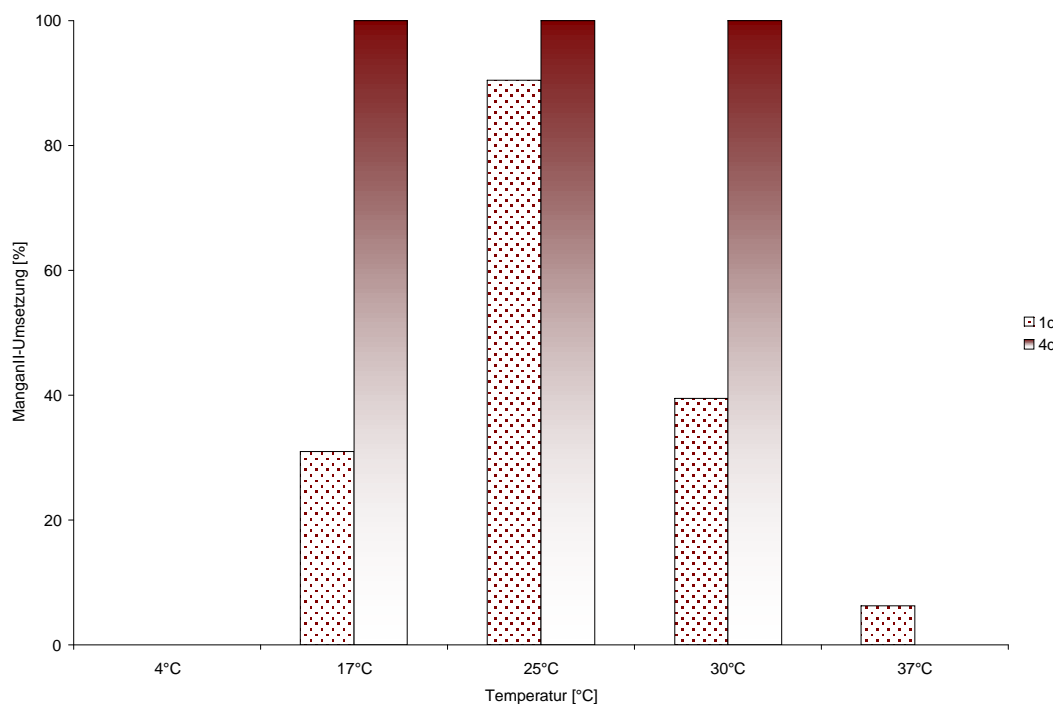


Abb. 164 Isolat KIN – prozentuale ManganII-Umsetzung in Abhängigkeit von der Temperatur

3.9.10.5 Isolat D1 – Der Einfluss der Temperatur auf die Manganoxidation

Isolat D1 zeigt erneut seine ungünstigen Eigenschaften als mögliche Starterkultur. Unter allen angebotenen Temperaturbedingungen findet in den Versuchsansätzen bis zum Versuchsabbruch nach 60d keine Manganoxidation statt.

Alle untersuchten Isolate zeigen ein Temperaturoptimum bezüglich der Manganoxidation von über 17°C. Bei 4°C zeigt nur Isolat R4 im Versuchsverlauf eine deutliche Manganoxidation. Dies zeigt zum einen erneut die große Toleranz der Manganoxidation durch Isolat R4 gegenüber ungünstigen Milieubedingungen, zum

anderen zeigt es, dass die technische Einsetzbarkeit der untersuchten Isolate nicht zuletzt von der Temperatur abhängt. Eine Temperaturanhebung um wenige Grad könnte dabei die Manganoxidation deutlich stimulieren. Dazu scheint aber ein aktives Eingreifen in die Wassertemperatur nicht nötig zu sein. Schon eine längere Verweilzeit im Produktionsprozess könnte die entsprechenden Resultate bringen.

3.9.11 Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation

Seit Beginn der Untersuchungen von eisen- und/oder manganoxidierenden Mikroorganismen im 19.Jh. stellt sich die Frage, welchen Zweck die Manganoxidation im Lebenszyklus der entsprechenden Organismen spielt. Nur in Einzelfällen konnte dies zweifelsfrei geklärt werden. Für das eisenoxidierende Bakterium *Gallionella ferruginea* konnte Hanert [HANERT 1968, 1975, 1989 UND GEBAUER 1978] einen **lithoautotrophen Stoffwechsel nachweisen. Ein solcher Stoffwechseltypus ist bislang für noch keinen manganoxidierenden Organismus nachgewiesen.**

Es wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere Hypothesen zu diesem Thema aufgestellt:

1. Katalytische Spaltung von Makromolekülen an $(\text{MnO}_2)_x(\text{H}_2\text{O})_y$ -Oberflächen [BROUWERS ET AL. 2000] zur weiteren metabolischen Nutzung.
2. Bildung von Dauerstadien bzw. Überdauerung von ungünstigen Umweltbedingungen in den Kapseln oder im Scheidenmaterial. Hierfür spricht das Phänomen, dass in Vorversuchen das Isolat KIN **aus 19 Jahre alten, nicht ausgetrockneten Schrägagarkulturen durch einfaches Überimpfen reaktiviert** werden konnte.
3. Energetischer Nutzen aus der Oxidation [ÜBERSICHT BEI BROUWERS ET AL. 2000].
4. Katalytische Zerstörung von Wasserstoffperoxid und damit Schutz der Zelle vor freien Radikalen [BROUWERS ET AL. 2000].

Sollte letztere Theorie zutreffen, so müsste durch eine subtoxische Zugabe von Wasserstoffperoxid ins Nährmedium die Manganoxidation der entsprechenden Mikroorganismen stimuliert werden können. Eine solche Möglichkeit könnte von

Bedeutung für den Einsatz von Starterkulturen sein. Denkbar wäre dabei, einen frisch beimpften Festbettreaktor mit zu reinigendem Wasser und einer entsprechenden Wasserstoffperoxidzugabe zunächst für kurze Zeit im Kreislaufbetrieb zu betreiben, um anschließend nach gründlichem Spülen den Filter für die Produktion freigeben zu können.

Zur Überprüfung, ob H_2O_2 einen Einfluss auf die Manganoxidationsgeschwindigkeit hat, wird das flüssige, gepufferte Basismedium mit H_2O_2 versetzt und anschließend mit den entsprechenden Isolaten beimpft (vgl. 2.8).

3.9.11.1 Isolate Th und L1 - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation

Der Einfluss von H_2O_2 auf die Manganoxidation der Isolate Th und L1 ist offenkundig. Entgegen der Vermutung, dass geringe Konzentrationen des Wasserstoffperoxid die Manganoxidation stimulieren können, wird sie schon bei der geringsten gewählten Konzentrationsstufe (0,0001%) vollständig gehemmt. Eine Manganoxidation findet lediglich im Ansatz ohne Wasserstoffperoxidzugabe statt (vgl. Abb. 165-166).

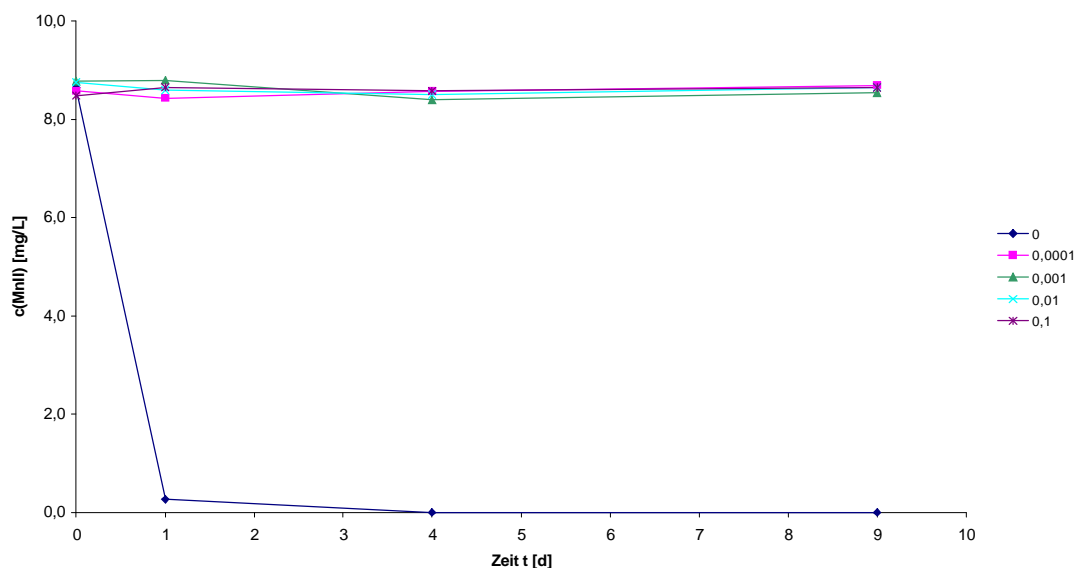


Abb. 165 Isolat Th – Abhängigkeit der Manganoxidation von der H_2O_2 -Konzentration im Medium. Schon bei geringsten H_2O_2 -Zugaben zum Medium tritt im Untersuchungszeitraum eine Hemmung der Manganoxidation ein.

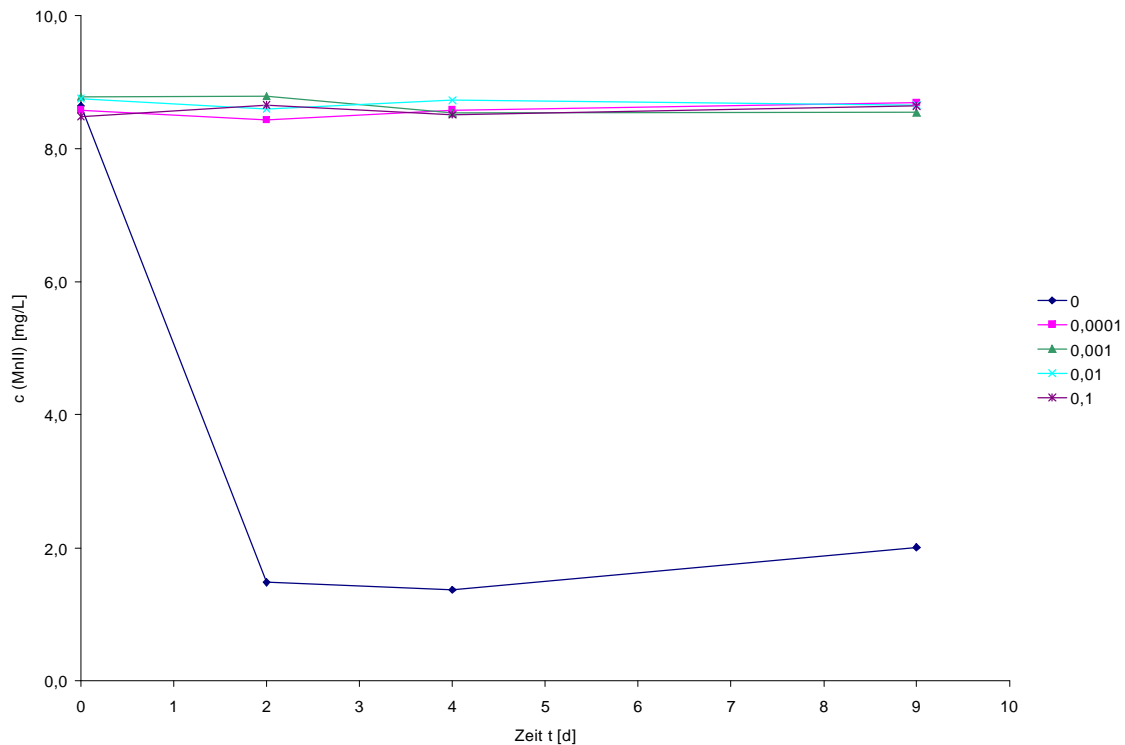


Abb. 166 Isolat L1 – Abhängigkeit der Manganoxidation von der H_2O_2 -Konzentration im Medium. Schon bei geringsten H_2O_2 -Zugaben zum Medium tritt im Untersuchungszeitraum eine Hemmung der Manganoxidation ein.

3.9.11.2 Isolat R4 - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation

Auch Isolat R4 zeigt den Einfluss von H_2O_2 auf die Manganoxidation. Die Manganoxidation wird allerdings erst bei deutlich höheren H_2O_2 -Konzentrationen, als bei den Isolaten L1 und Th (0,1% und 0,01%) gehemmt. Bei 0,001% ist eine Verzögerung der Manganoxidation erkennbar, während die Zugabe von 0,0001% keinen erkennbaren Einfluss auf die Manganoxidation zu haben scheint. **Die Manganoxidation durch Isolat R4 ist also auch gegenüber Wasserstoffperoxid stabiler, als bei den Isolaten Th und L1.**

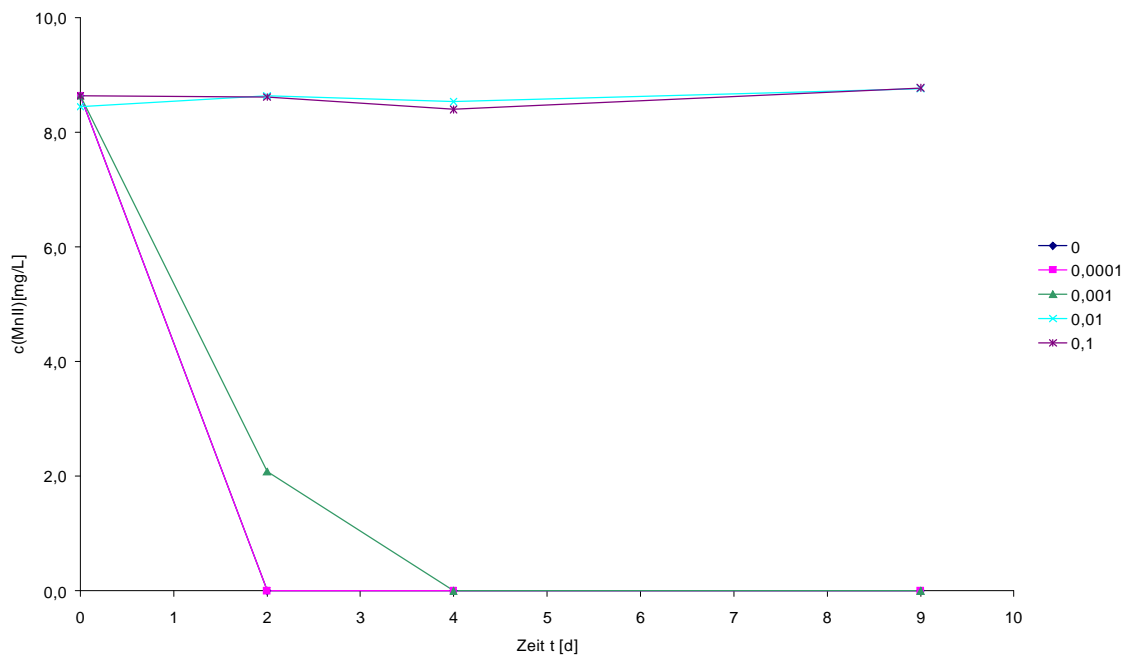


Abb. 167 Isolat R4 – Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation im Medium. Bei mittleren H_2O_2 -Konzentrationen zum Medium tritt im Untersuchungszeitraum eine vollständige Hemmung der Manganoxidation ein.

3.9.11.3 Isolat KIN - Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Manganoxidation

Die Manganoxidation durch Isolat KIN wird erst bei 0,1% Wasserstoffperoxid im Medium unterbunden. Alle anderen Medien zeigen eine vollständige Manganoxidation nach 48h (vgl. Abb. 168). Die Toleranz der untersuchten Isolate gegenüber dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid ist bei Isolat KIN am stärksten ausgeprägt. **Eine signifikante Manganoxidation findet bis zu Konzentrationen von 0,01% statt.** Alle anderen Isolate zeigen schon bei geringeren Konzentrationen eine Hemmung der Manganoxidation. Bei Isolat D1 findet im Versuchszeitraum (60d) keine Manganoxidation statt.

Die Hypothese, dass subtoxische Konzentrationen von H_2O_2 die Manganoxidation stimulieren könnten, ist bei den untersuchten Isolaten widerlegt.

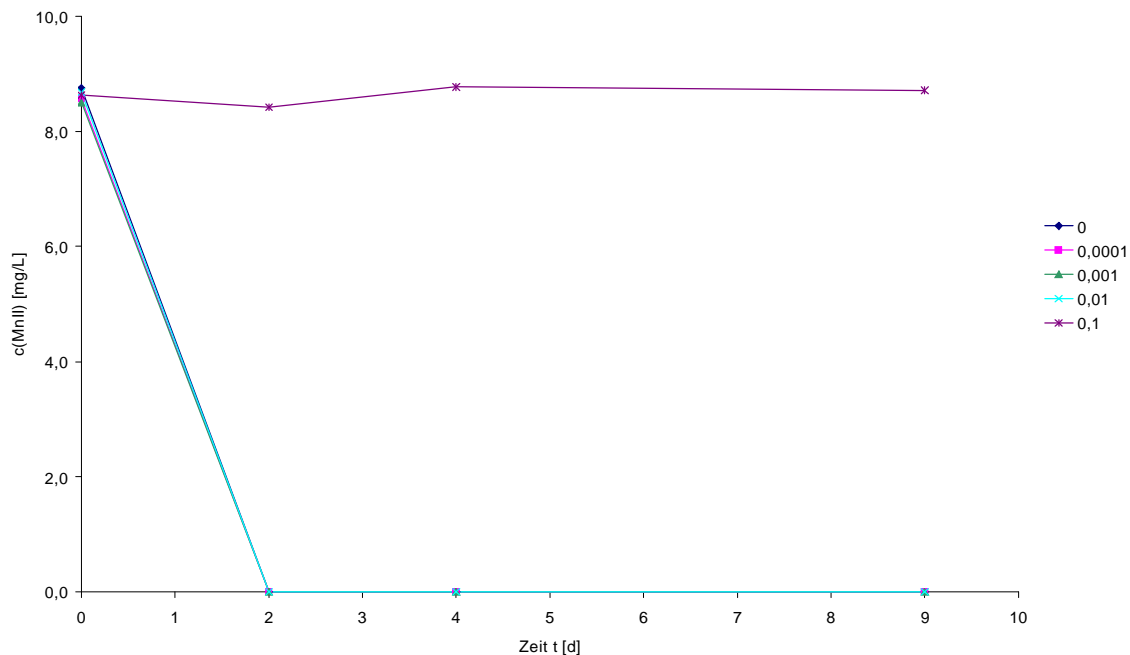


Abb. 168 Isolat KIN – Abhängigkeit der Manganoxidation von der H_2O_2 -Konzentration im Medium. Erst bei 0,1% H_2O_2 im Medium tritt eine Hemmung der Manganoxidationstätigkeit auf.

3.10 Testfiltrationen zum Einsatz von Starterkulturen für die natürlich-biologische Entmanganung von Trink- und Mineralwässern

Die hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften untersuchten Isolate sollen in der Folge bezüglich Ihrer Fähigkeiten zur Entmanganung in Festbettreaktoren untersucht werden. Dafür wird eine halbtechnische Anlage installiert (vgl. Abb.169), die im Kern aus einer Enteisungsstufe und einem vierstufigen Entmanganungs-Festbettreaktor besteht (vgl. Abb. 169 und Abb. 171). Es soll zunächst untersucht werden, ob sich die Isolate schnell und in ausreichender Zahl an den angebotenen Kiesoberflächen ansiedeln, und ob sie in genügend kurzer Zeit für eine Kontaktfiltration mit einer ManganII-Endkonzentration von unter 0,05mg/L MnII sorgen können. Dies entspricht dem Grenzwert der TWV und dem Richtwert der MTV. Diejenigen Mikroorganismen, die ohne zur Verfügung gestellte Oberflächen eine schnelle Manganoxidation induzieren können (vgl. 3.9.7) sollten dabei im Vorteil sein, da sie über eine Flockenbildung auch ohne Aufwuchskörper für eine Manganoxidation sorgen können.

Die Flockenbildung birgt allerdings die Gefahr, dass der Festbettreaktor schon beim Beimpfen zugesetzt wird und sich damit der Filterwiderstand unverhältnismäßig erhöht. Hinzu kommt, dass vor Beginn der Untersuchungen nicht abzusehen war, in welchem Abschnitt des Festbettreaktors die Milieubedingungen für die Manganoxidation optimal sein würden, so dass der Festbettreaktor in der in Nr. 2.8 dargestellten Art und Weise gleichmäßig über das gesamte Filterbett beimpft wird. Die Belüftung wird durchgeführt, da in den Voruntersuchungen (vgl. 3.9.2) ein deutlicher Zusammenhang zwischen ausreichender Sauerstoffzufuhr und Manganoxidation festgestellt wurde. Die anschließende Zugabe von reinem Sauerstoff dient neben der weiteren Anhebung der Sauerstoffkonzentration auch der Anhebung des Redoxpotentials, da zu Beginn der Untersuchungen nicht absehbar war, ob das mit der Belüftung erreichte Redoxpotential für eine natürlich-biologische Entmanganung ausreichend sein kann.

Das für die Untersuchungen genutzte Grundwasser kam aus einem Grundwasserbrunnen, der sich unter dem Biozentrum der TU Braunschweig befindet und wurde mit einer Excenter-Schneckenpumpe gefördert.

Die wichtigsten Parameter des Wassers sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Temperatur	ca. 9°C
Eisen II	3,0 mg/L
ManganII	1,8-2,0 mg/L
Redox	+ 260 mV vor der Enteisungsstufe
pH-Wert	6,9
N-NH ₄	< 0,5mg/L
Sauerstoffgehalt	< 1% Sättigung

Tab. 13

3.10.1 Testfiltration eines organik- und stickstoffarmen reduzierten Grundwassers (Biozentrum eigener Brunnen)

Für die Testfiltration wurde die in Abb. 169 schematisch dargestellte Testanlage genutzt. Die Enteisung in der Enteisungsstufe erfolgt durch eine Gallionella ferruginea-Enteisung (ebenfalls Kontaktfiltration) und ist am Ausfluss der

Enteisenungsstufe vollständig. Sie kann damit die Entmanganungsleistung nicht beeinflussen.

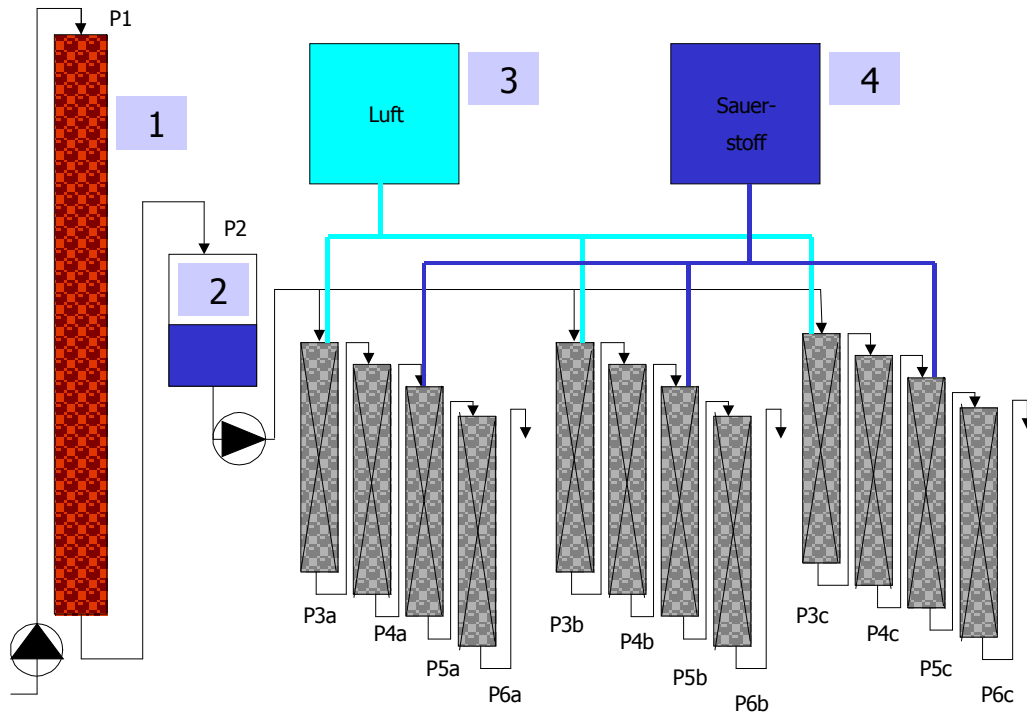


Abb. 169 Testanlage zur Untersuchung der Entmanganungsleistung der vorliegenden Isolate
P1 – P6c – Probenahmestellen

- 1 – Enteisenungsstufe
- 2 – Zwischenbehälter zum Druckausgleich
- 3 – Belüftungseinheit
- 4 – Sauerstoffbegasung

3.10.1.1 Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten Th und L1 als Starterkulturen

Zur Untersuchung der Entmanganungsleistung der Isolate Th und L1 wurden die in Reihe geschalteten Testsäulen zunächst wie unter 2.8 beschrieben beimpft und für 24h im Kreislaufbetrieb gefahren. Anschließend wird auf Durchflussbetrieb mit einer Filtrationsgeschwindigkeit von 1m/h umgestellt und nach 4h die erste Probenahme durchgeführt. Bereits bei der ersten Probenahme ist im Auslauf P5a (dritte Teilsäule der Testanlage für Isolat Th) kein MnII mehr nachweisbar (vgl. Abb. 170). An der Probenahmestelle P3a sind bereits ca. 70% des MnII aus dem Wasser entfernt, an

P4a schon weit über 90%. Diese Werte sinken in den folgenden Tagen geringfügig ab, so dass nach 4d an Probenahmestelle P3a noch ca. 50% eliminiert sind und an Stelle P4a unter 90%. Dennoch bleibt auch hier der Auslauf MnII-frei. Bis zum 8.Tag steigen die Entmanganungsleistungen auch dieser Teilbereiche der Testanlage wieder auf die Werte an, die bereits nach 4h zu verzeichnen waren (vgl. Abb. 170). In den ersten Tagen verfärben sich zunächst die zugeimpften Biomasseflocken, später auch der Rest der Testsäulen braun-schwarz, so dass die Entmanganung auch optisch erkennbar wird (vgl. Abb. 171).

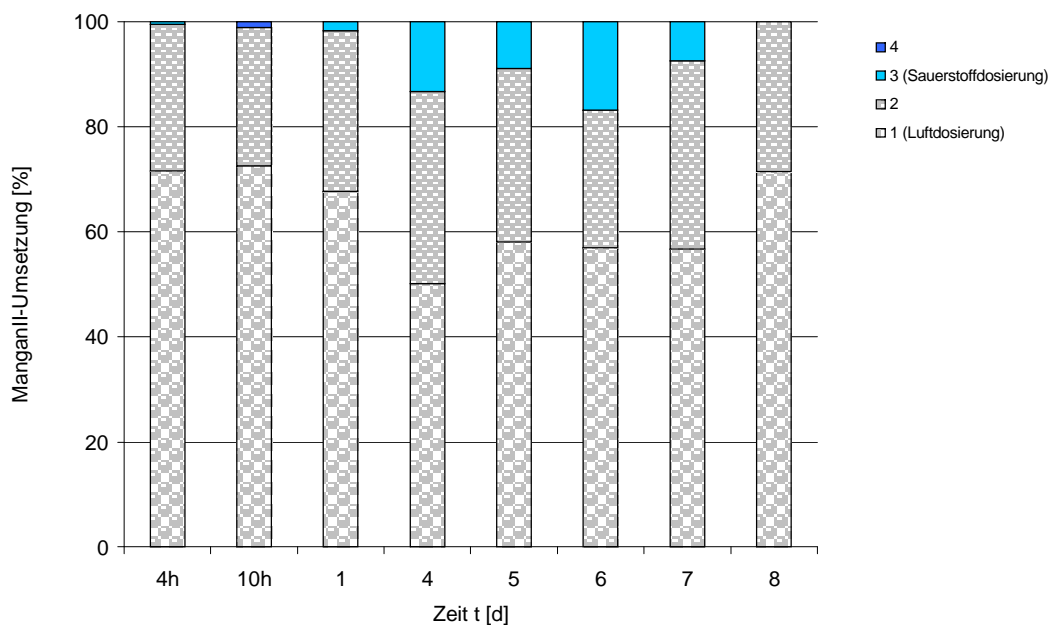


Abb. 170 Testanlage A beimpft mit Isolat Th. Bereits nach 4h ist eine quantitative Entfernung des MnII nachweisbar (davon gut 70% in der Säule 1)

Isolat L1 zeigt bei der ersten Messung nach 4h eine über 60%ige Entmanganungsleistung. Davon wird der überwiegende Anteil (ca. 40%) in der Teilstufe 3 der Testanlage eliminiert. Die Entmanganungsleistung dieser Testanlage steigt zwar bis nach 24h auf über 80% an, kann sich aber nicht stabilisieren und schwankt in der Folge um 60%. Auffällig ist, dass der Hauptanteil der Entmanganung stets in den Teilsäulen 1 und 2, also in den mit Umgebungsluft belüfteten Anlagenteilen abläuft (vgl. Abb. 172-173). Die sauerstoffbegasten Anlagenteile tragen nur untergeordnet zur Entmanganung bei.



Abb. 171 Testanlage zur Entman-
ganung beimpft mit Isolat Th nach
7d Laufzeit. Vor allem die Teilsäulen
1 und 2 zeigen bereits eine deutliche
Verockerung

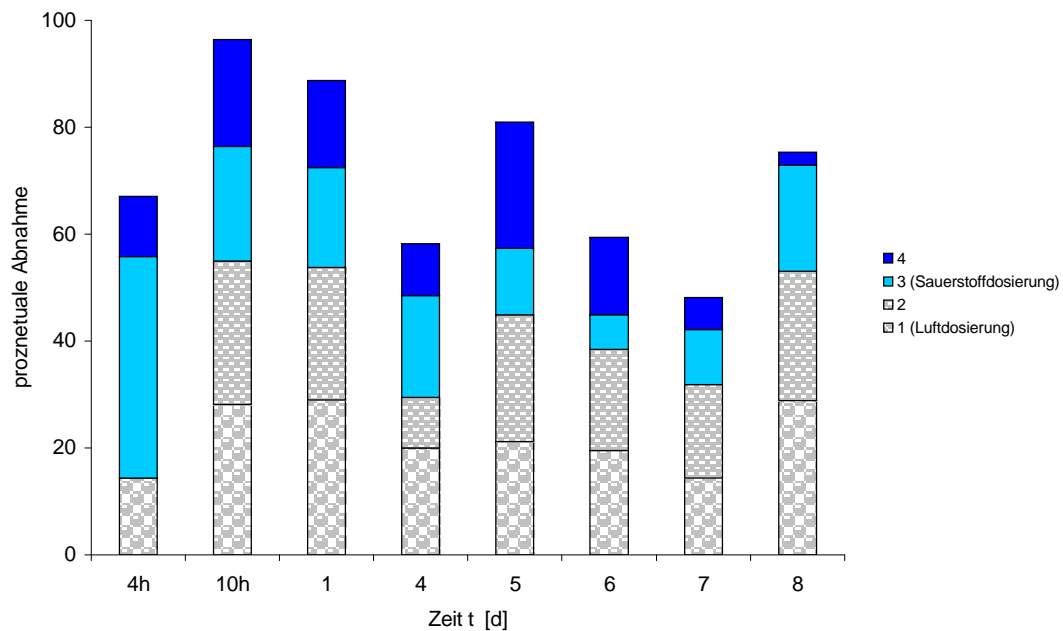


Abb. 172 Testanlage B beimpft mit Isolat L1. Nach 4h sind bereits ca. 60% des gelösten
MnII eliminiert. Die Rückhaltewerte schwanken in der Folge etwa um diesen Wert.



Abb. 173 Testanlage zur Entmanganung beimpft mit Isolat L1 nach 7d Laufzeit. Die Verockerungen sind über alle Anlagenteile verteilt, aber nicht so deutlich ausgeprägt, wie bei Isolat Th

Die unbeimpfte Kontrolle zeigt in den ersten Tagen keinerlei Entmanganungsleistung. Diese setzt erst nach ca. sechs Tagen ein (ca. 15%ige Entmanganung) und steigert sich bis zum Tag 8 auf ca. 30% (vgl. Abb. 174).

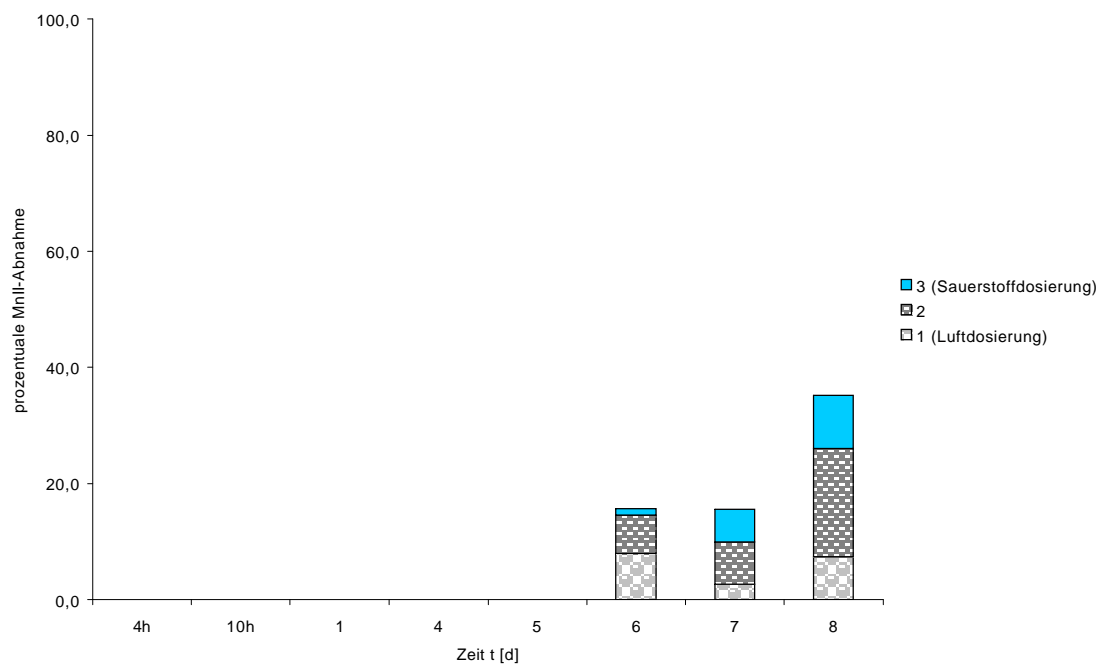


Abb. 174 Testanlage C- unbeimpfte Kontrolle. Nach acht Betriebstagen zeigen sich hier erst gut 20% Entmanganungsleistung.



Abb. 175 Testanlage zur Entmanganung - unbeimpfte Kontrolle nach 7d Laufzeit. Es sind keine Verockerungen im Kiesbett erkennbar.

Die pH-Werte steigen im Laufe der Aufarbeitung von 6,9 (Zulauf zur Enteisung) bis auf 7,1 (Zulauf zur Entmanganung) bzw. ca. 7,6 im Ablauf der Entmanganungssäulen an. Die Werte des Redoxpotentials steigen in den ersten Stunden nach Inbetriebnahme der Anlage um 50-100 mV an und bleiben dann im Versuchsverlauf nahezu stabil. Sie steigen innerhalb der Testanlage stetig von ca. 230mV im Zulauf über 360mV nach der Enteisungsstufe bis auf Werte zwischen 460mV (Zulauf Entmanganungssäule1) und 510mV (Zulauf Entmanganungssäule4) an. Die Werte sind in allen drei Testanlagen (Beimpft mit Isolat Th, beimpft mit Isolat L1 und unbeimpfte Kontrolle) vergleichbar und werden in Abb. 176 exemplarisch für Isolat Th dargestellt.

Die eingesetzten Zellzahlen waren annähernd gleich (vgl. Abb. 2.8). **Dennoch zeigt Isolat Th die weitaus effektivere und stabilere Entmanganungsleistung.** Schon bei der ersten Messung nach 4h Durchflussbetrieb ist im Ablauf der mit Isolat Th beimpften Testanlage kein MnII mehr nachweisbar. Isolat L1 kommt auf lediglich 60% Entmanganungsleistung. Im weiteren Verlauf des Testbetriebes schwankt die Leistung des Isolats zwischen 50 und 80% Entmanganungsleistung. Das Isolat Th zeigt in den ersten Tagen eine Verringerung der Entmanganungsleistung in den

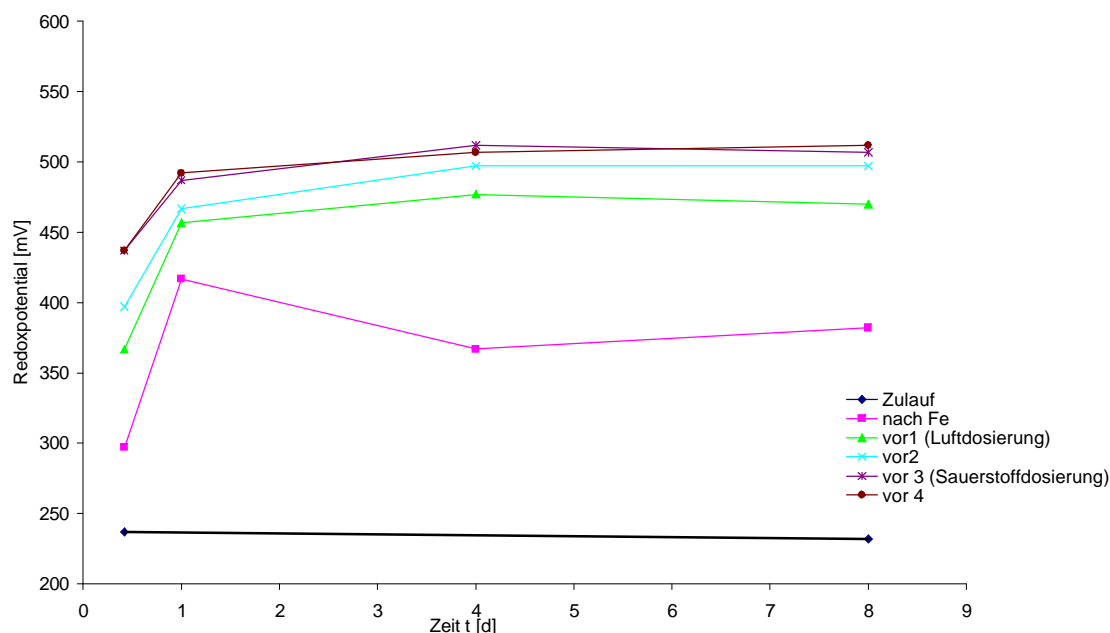


Abb. 176 Zeitlicher Verlauf des Redoxpotentials in Testanlage A. Die Redoxpotentialwerte steigen nach Versuchsbeginn deutlich an und bleiben dann über den Versuchszeitraum nahezu konstant.

ersten beiden Testsäulen. Im Anschluss an diese kurze schwächere Phase steigt die Entmanganungsleistung (offenbar aufgrund besserer Adaption) wieder deutlich an und erreicht am Tag acht wieder das Niveau der ersten Betriebstage. Die vollständige Entfernung des ManganII im Durchflussbetrieb bereits nach 4h war nicht ohne weiteres zu erwarten, da die Entmanganungsleistung durch Isolat Th in den physiologischen Versuchen nur gelegentlich ähnlich schnell verlief und das vorliegende Wasser mit seinen physikalisch-chemischen Voraussetzungen (vor allem der niedrigen Temperatur) nicht den optimalen Milieubedingungen des Isolats Th entspricht (vgl. Tab. 14).

Parameter	Brunnenwasser	Optima für die Manganoxidation					
		Th	L1	R4	R1	KIN	D1
Temperatur	Ca. 9°C	25°C ab 4°C	17- 25°C	25- 30°C	n.b.	25°C	n.b.
PH-Wert	7,4-7,6 nach Belüftung und Enteisenung	6,0-7,5	6,0-7,0	6,0-7,5	n.b.	6,0-7,5	7,0
Organikgehalt	<< 10mg/L	50- 250mg/L	50- 250mg/L	0,5- 250mg/L	n.b.	0,5- 250mg/L	5mg/L
Sauerstoffgehalt	Gesättigt nach Belüftung und Enteisenung	10%	100%	10%	n.b.	10%	n.b.

Tabelle 14: Vergleich der physikalisch-chemischen Parameter des untersuchten Wassers mit den Optima für die Manganoxidation der untersuchten Isolate.

Der Vergleich der optimalen Bereiche der Manganoxidation der Isolate Th und L1 mit den Werten des Brunnenwassers zeigt deutlich, dass das Isolat Th in deutlich größeren Bereichen Manganoxidation durchführt, als Isolat L1. Deutlich und signifikant wird dies bei den Parametern Temperatur und pH-Wert. Während Isolat Th bei pH 7,5 noch zur Manganoxidation befähigt ist, bleibt diese bei Isolat L1 aus (vgl. 3.9.1). Isolat Th zeigt darüber hinaus schon bei 4°C eine signifikante Manganoxidation, bei Isolat L1 setzt sie erst in höheren Temperaturbereichen ein. Die Adaptionsfähigkeit des Isolats L1 reicht also offenbar nicht aus, um ein Wasser eines pH-Wertes von ca. 7,5 und einer Temperatur von unter 10°C ähnlich gut vom ManganII zu befreien, wie Isolat Th. Der in den physiologischen Untersuchungen ermittelte höhere Sauerstoffbedarf, gegenüber Isolat Th wirkt sich in der Testfiltration offenbar aus. Möglicherweise könnte auch eine noch intensivere Beimpfung mit Isolat L1 die Werte der Entmanganung verbessern, aber unter vergleichbaren Bedingungen ist Isolat Th offenbar deutlich zuverlässiger in der Entmanganung des vorliegenden Brunnenwassers.

3.10.1.2 Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten R4 und R1 als Starterkulturen

Isolat R4 hat sich in den physiologischen Untersuchungen als sehr robust gegen äußere Bedingungen (z.B. erhöhte Schwermetallkonzentrationen, hohe und niedrige Temperaturen, hohe pH-Werte oder extreme ManganII-Konzentrationen) erwiesen. Isolat R4 soll an dieser Stelle mit Isolat R1, einem weiteren Vertreter der Gattung *Leptothrix* verglichen werden, der in den physiologischen Untersuchung nicht näher charakterisiert wurde, aber möglicherweise ein ähnliches Entmanganungspotential, wie die Isolate Th, L1 und R4 besitzen könnte, denn die Manganoxidation auf Festmedien durch Isolat R1 zeichnet sich durch äußerst intensive und großflächigen Braunfärbungen auf den Agarplatten aus.

Isolat R4 zeigt in der Testfiltration eine ähnliche Charakteristik, wie Isolat Th. Auch hier sind bei der ersten Messung nach 4h Durchflussbetrieb bereits 100% des ManganII zurückgehalten, davon über 70% in der mit Luft

begasten Testsäule1 (vgl. Abb. 177). In der Folge stellt sich ein ähnliches Phänomen ein, das auch schon bei Isolat Th beobachtet werden konnte. Die Entmanganungsleistung der Testsäule 1 nimmt ab (unter 40%), um zu den folgenden Messpunkten hin wieder deutlich anzusteigen. Nach 9d findet die Manganoxidation vollständig im Teil 1 der Testfiltrationsanlage statt.

Isolat R1 zeigt eine ähnliche Verlaufskurve, auch wenn die Effektivität und die Geschwindigkeit der Entmanganung nicht mit denen des Isolats Th zu vergleichen sind (vgl. Abb. 178). Bei der ersten Messung nach 4h Durchflussbetrieb erreicht Isolat R1 eine Entmanganungsleistung von lediglich über 30%, die nach 24h auf sogar noch 15% absinkt. **Auch hier steigt die Reinigungsleistung in den folgenden Tagen wieder an und erreicht am neunten Betriebstag die vollständige Entmanganung.**

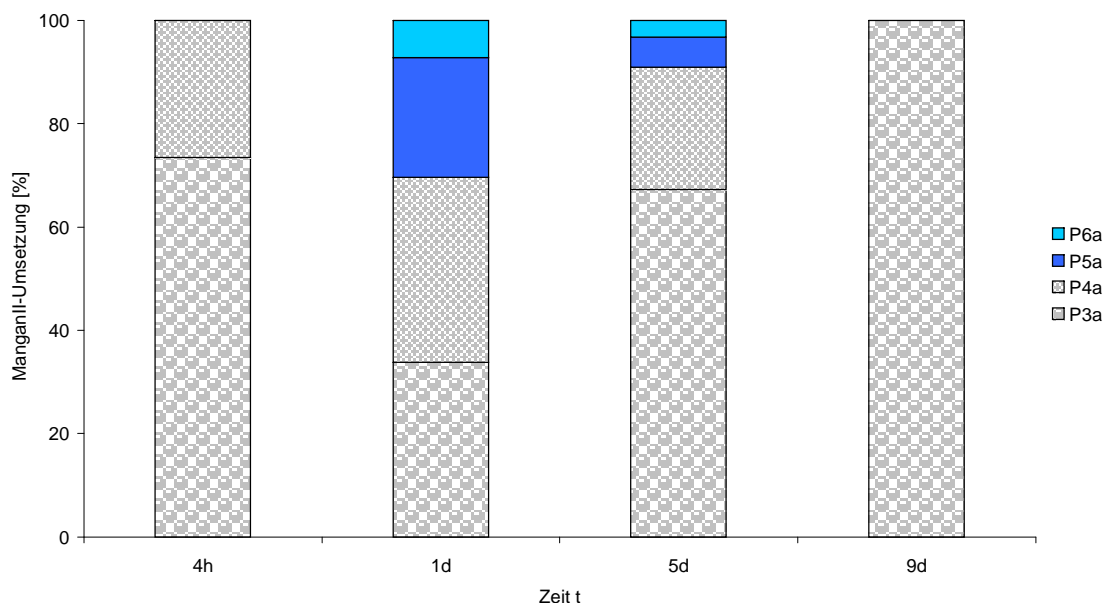


Abb. 177 Testanlage A beimpft mit Isolat R4. Bereits nach 4h ist eine quantitative Entfernung des MnII nachweisbar (davon gut 70% in der ersten Säule).

Die unbeimpfte Kontrolle zeigt zwar ebenfalls einen Anstieg der Reinigungsleistung über die Zeit, dieser fällt jedoch im Vergleich zu den Isolate R1 und R4 eher gering aus und steigt bis zum Tag 9 der Messungen kaum über 40% an (vgl. Abb. 179). Isolat R4 beweist hier erneut seine Adaptionfähigkeit. Im Rahmen der physiologischen Untersuchungen zeigt Isolat R4 breite Oxidationsfenster bei den meisten der getesteten Parameter. Isolat R1 zeigt nach einigen Tagen der

„Einarbeitung“ ebenfalls eine 100%ige Entmanganungsleistung und ist damit besser als Starterkultur für das vorliegende Grundwasser geeignet, als Isolat L1.

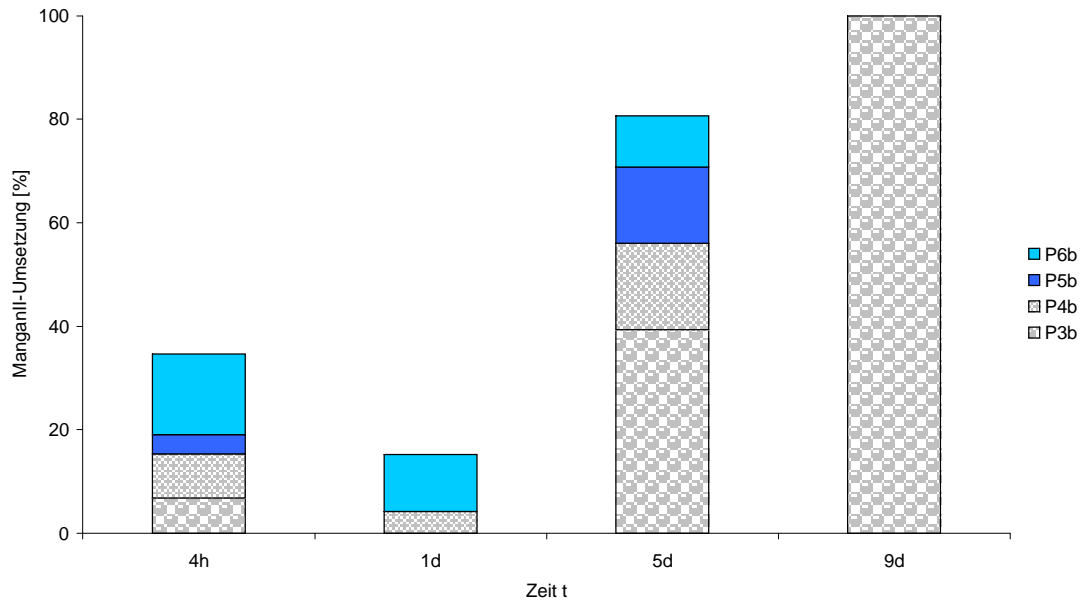


Abb. 178 Testanlage B beimpft mit Isolat R1. Nach 4h sind hier ca. 35% des gelösten MnII entfernt. Nach 5d ist diese Quote jedoch bereits auf 80% angestiegen und nach 9d tritt eine vollständige MnII-Entfernung ein.

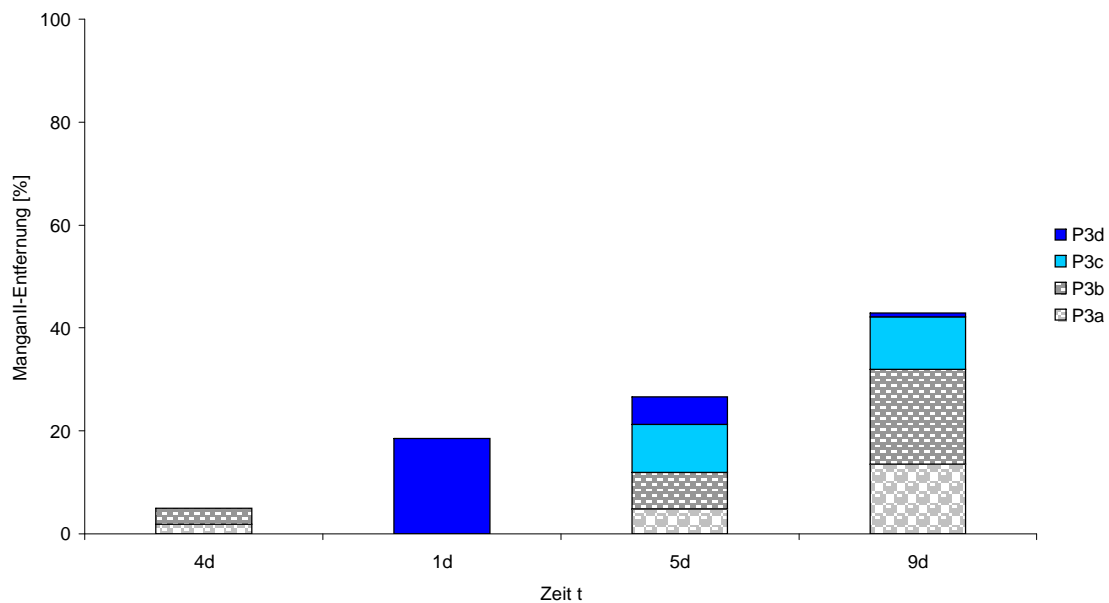


Abb. 179 Unbeimpfte Kontrolle – Testfiltration. Bis zum Versuchsabbruch nach 9d sind ca. 40% des gelösten MnII eliminiert.

Abb. 180 verdeutlicht, in welchen Größenordnungsbereichen die Redoxpotentiale an den einzelnen Messpunkten für Isolat R4 liegen. Sie steigen tendenziell in Durchflussrichtung an. Im Zulauf liegt das Redoxpotential noch bei ca. 230mV, steigt dann nach 24h Durchflussbetrieb am Messpunkt 1 auf ca. 300mV an und erreicht am Messpunkt P6a ca.430mV. Gegen Ende der Untersuchungen ist das Redoxpotential an den einzelnen Messpunkten (Ausnahme: Zulauf P1) noch einmal kräftig angestiegen, so dass hier Werte zwischen 410mV (P2) bis 490 mV (P6a) erreicht werden. Diese Werte sind mit denen des Isolats R1 und der unbeimpften Kontrolle nahezu deckungsgleich, so dass auf eine Darstellung dieser Werte hier verzichtet wird.

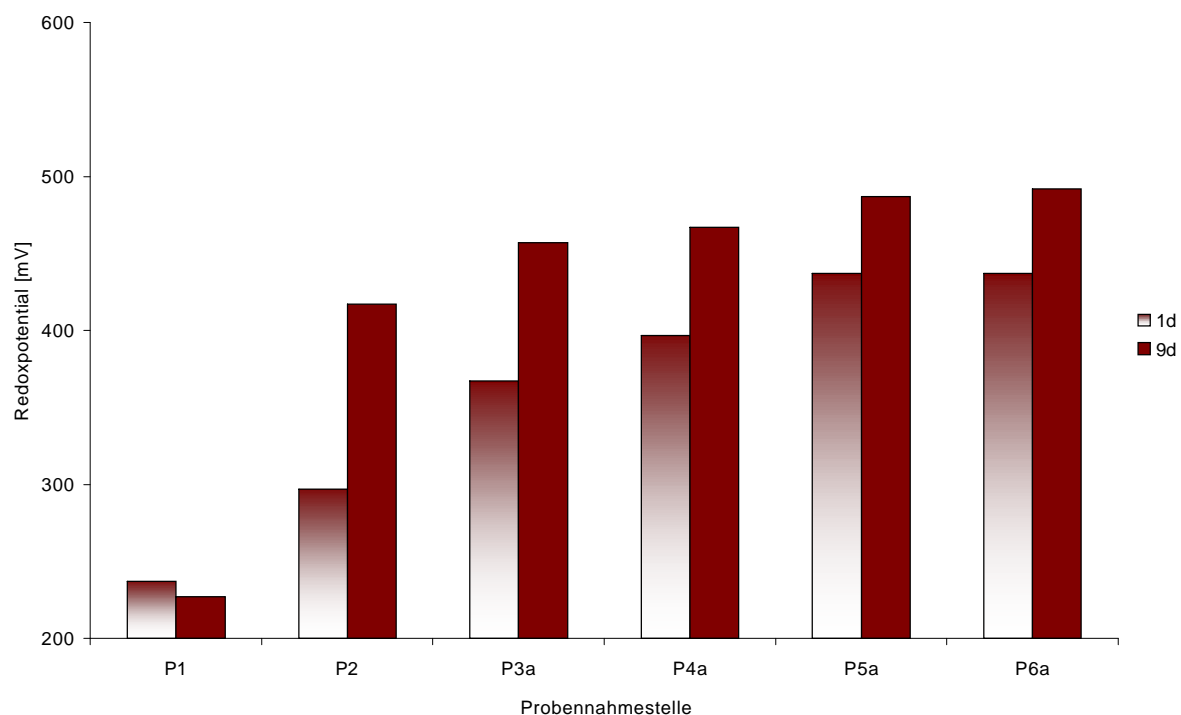


Abb. 180 Isolat R4 - Redoxpotential in der Testanlage nach 1d und nach 9d. Das Redoxpotential steigt vom Zulauf bis zu Ablauf der Testanlage um ca. 270mV an.

3.11.1.3 Testbetrieb zur natürlich-biologischen Entmanganung mit den Isolaten KIN und D1 als Starterkulturen

Die Isolate KIN und D1 wurden ebenfalls als Starterkulturen in die Testfiltrationsanlage eingebracht. Bei beiden Isolaten musste jedoch festgestellt werden, dass sie sich offenbar nicht an den angebotenen Kiesoberflächen festsetzen

konnten. Die Zellzahlen im Überstand der einzelnen Teilreaktoren blieben während des Kreislaufbetriebes nahezu konstant. Die Entmanganungsraten in beiden Ansätzen waren nahezu identisch mit dem unbeimpften Kontrollansatz. Auch eine deutliche Verlängerung des Kreislaufbetriebes führte nicht zu einer befriedigenden Kontaktfiltration. **Beide Isolate blieben wirkungslos.** Auch eine Veränderung des Aufwuchsmaterials von einer Korngröße von 1,5-4mm auf 0,1-0,5mm und 0,4-1mm zur Vergrößerung der Oberfläche des Kiesmaterials zeigte keinen positiven Effekt. Die einzelnen Werte zur Entmanganungsleistung, zum pH-Wert oder zum Redoxpotential werden an dieser Stelle nicht dargestellt. Die hier angewandte Beimpftechnik (vgl. 2.8) ist offenbar nicht für die Ansiedlung der Isolate KIN und D1 und deren Manganoxidation geeignet. Möglicherweise kann eine Veränderung dieser Technik Abhilfe schaffen. Die entsprechenden Parameter sind noch zu klären.

3.11.3 Testfiltrationen an einem organikreichen und stickstoffreichen, reduzierten Grundwasser (Mineralwasserbetrieb im südlichen Niedersachsen)

Neben der Testfiltration im Grundwasser soll nun auch eine Testfiltration in einem Mineralbrunnenbetrieb die Einsatzmöglichkeit der untersuchten Isolate als Starterkulturen belegen. Das zur Verfügung stehende Wasser zeichnet sich durch eine völlig andere Charakteristik aus, als das Grundwasser, das aus dem Brunnen im Biozentrum bezogen werden kann. Das zu reinigende Mineralwasser zeichnet sich durch seinen sehr hohen EisenII-Gehalt (ca.14mg/L), sowie einen geringeren ManganII-Gehalt (ca. 0,5mg/L) aus. Die auffälligsten Merkmale dieses Wassers sind jedoch sein hoher Ammoniumgehalt, der bei 11-12mg/L liegt, sowie der für ein Grundwasser relativ hohe Gehalt schwer abbaubarer organischer Bestandteile, der sich aus einem hohen Huminstoffanteil im Boden erklärt (ursprünglich mooriges Gelände).

Temperatur	ca. 9°C
Eisen II	14,0 mg/L
ManganII	0,4-0,6mg/L
Redox	- 150mV
DOC	0,8 mg/L
pH	6,9
Sauerstoffgehalt	< 1% Sättigung im Rohwasser; im Zulauf zur Entmanganungstestanlage ist das Wasser übersättigt mit Sauerstoff

Tab. 15 Physikalisch-chemische Parameter des untersuchten Mineral- Rohwassers

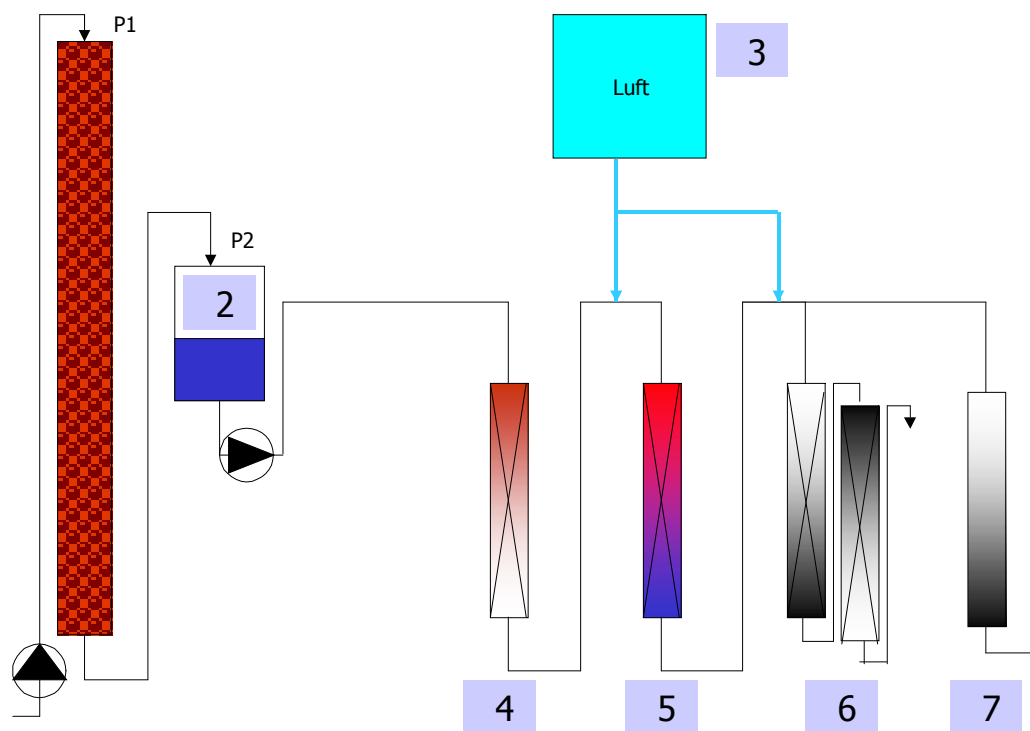


Abb. 181 Schematische Übersicht der Testfiltration im Mineralbrunnenbetrieb zur Entmanganung

- 1 – Haupt-Enteisenungsstufe
- 2 – Zwischenbehälter zum Druckausgleich
- 3 – Belüftungseinheit
- 4 – Stufe zur „Restenteisung“
- 5 – „geplante Nitrifizierung“
- 6 – Entmanganungsstufe mit Starterkultur Th
- 7 – unbeimpfte Kontrollsäule

Vor allem die hohe Ammoniumkonzentration im Wasser ist ungünstig, da im Durchlauf durch den Festbettreaktor ammoniumoxidierende Mikroorganismen

(hauptsächlich Bakterien der Nitroso-Gruppe) zu überhöhten Nitritwerten führen können, die das Wasser aufgrund der toxikologischen Problematik des Nitrits unverkäuflich machen würden (vgl. Nr. 1.1.3.2). Auch eine Weiteroxidation des entstandenen Nitrits zu Nitrat ist nur bedingt erwünscht, da dies rechnerisch Nitratkonzentrationen von über 40mg/L zu Folge haben könnte, was gemäß §9 (3) der MTV dazu führen würde, dass das Wasser nicht mehr mit der Auslobung „geeignet für die Zubereitung von Säuglingsnahrung“ beworben werden könnte. Das Wasser wäre aber dennoch verkehrsfähig. Neben den rechtlichen Folgen einer Oxidation des Ammoniums zu Nitrit oder Nitrat gibt es auch verfahrenstechnische Probleme. Bei gleichzeitigem Auftreten von Ammonium und ManganII muss zunächst das Ammonium oxidiert werden (s. Stabilitätsdiagramm für FeII, NH₄ und ManganII [u.a. in MOUCHET 1992], bevor die Manganoxidation stattfinden kann. Dies kann in einem gezielt eingesetzten weiteren Teil der Filteranlage, einer „geplanten Nitrifizierungsstufe“ gewährleistet werden. Einen Überblick über die Rolle autotropher Nitrifizierer auf die Manganoxidation gibt Vandenabeele [VANDENABEELE ET AL. 1995]. Neben der Entwicklung der Mangankonzentrationen wird daher auch die Entwicklung der Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat kontrolliert.

Die Erfahrungen aus den halbtechnischen Versuchen zur Entmanganung des Grundwassers im Biozentrum der TU Braunschweig zeigen, dass es nicht zwangsläufig notwendig ist, vier Entmanganungsfilter in Reihe zu schalten um bei den gegebenen Durchflussmengen eine Entmanganung zu gewährleisten, die zu einer Mangankonzentration unter 0,05mg/L führt. Daher werden hier nur zwei Filter in Reihe geschaltet. Auf eine Sauerstoffzudosierung wird zunächst verzichtet, da sich auch diese in den Vorversuchen als nicht zwingend erforderlich herausgestellt hat. Eine Luftbegasung reicht offenbar völlig aus.

Im Rahmen eines Vorversuches zur Anreicherung und Isolierung manganoxidierender Mikroorganismen aus dem zu untersuchenden Mineralbrunnenwasser konnte bei mikroskopischen Untersuchungen festgestellt werden, dass die für die Entmanganung und die Enteisung hauptsächlich verantwortlichen

Mikroorganismen aus der Gattung Leptothrix stammen (höchstwahrscheinlich aus der Art Leptothrix discophora) [Abb. 181a].

Da die Isolierung dieser brunneneigenen Mikroflora nicht gelang, wurde **das Isolat Th als geeignete Starterkultur für das Mineralrohwasser ausgewählt**. Die Anreicherung und Beimpfung der Starterkultur verlief analog den unter 3.10.1.1 dargestellten Versuchen

Die Entmanganungsleistung des eingesetzten Isolats Th ist auch bei diesem Wasser mehr als zufriedenstellend. Bei der ersten Messung nach 3,5h ist der Manganwert im Ablauf der beimpften Säulen bereits auf einen Wert im Bereich des Zielwertes (Grenzwert der Trinkwasser-Verordnung) von 0,05mg/L gefallen. Bei leichten Schwankungen bleibt dieser Wert über den gesamten Versuchsverlauf konstant. Die Werte der unbeimpften Kontrolle

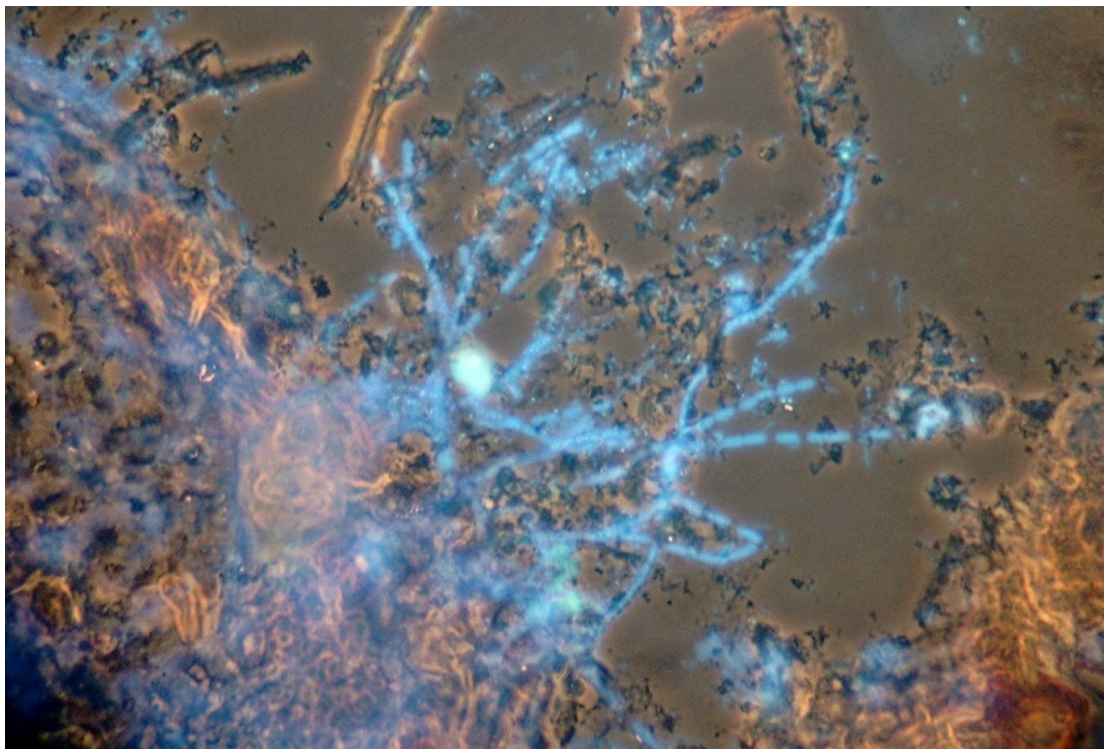


Abb. 181a Mikroskopische Aufnahme der Anreicherungskultur aus dem untersuchten Mineralbrunnenwasser. Überlagerte Phasenkontrast-Fluoreszenzaufnahme.

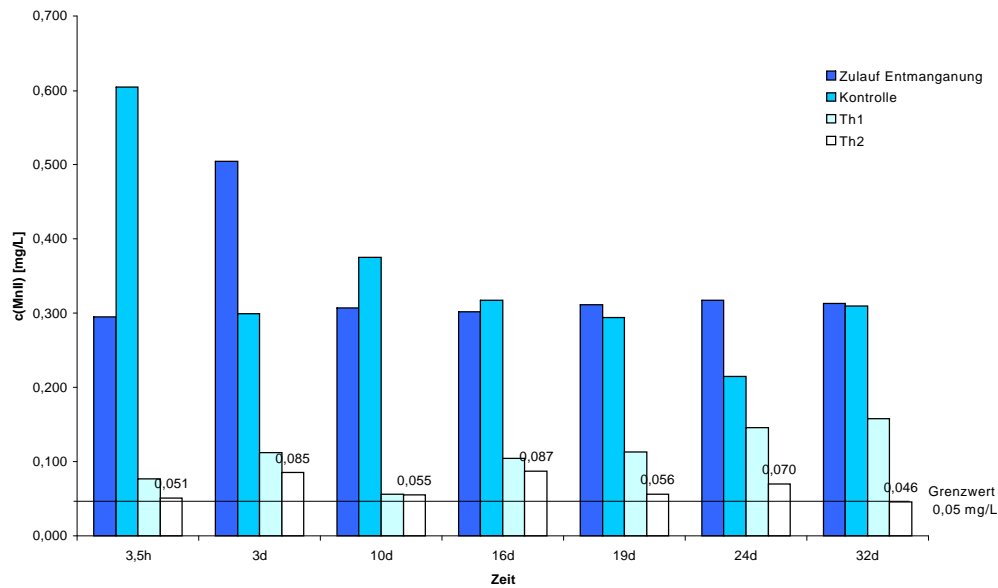


Abb. 182 ManganII-Umsetzung in den einzelnen Teilen der Testanlage. Bereits bei der ersten Messung nach 3,5h sind nur noch 0,051mg/L ManganII im Ablauf messbar. Der Grenzwert der MTV ist damit praktisch erreicht.

bleiben ebenfalls konstant, allerdings im Bereich der Werte des Zulaufes (0,3mg/L) (vgl. Abb.182).

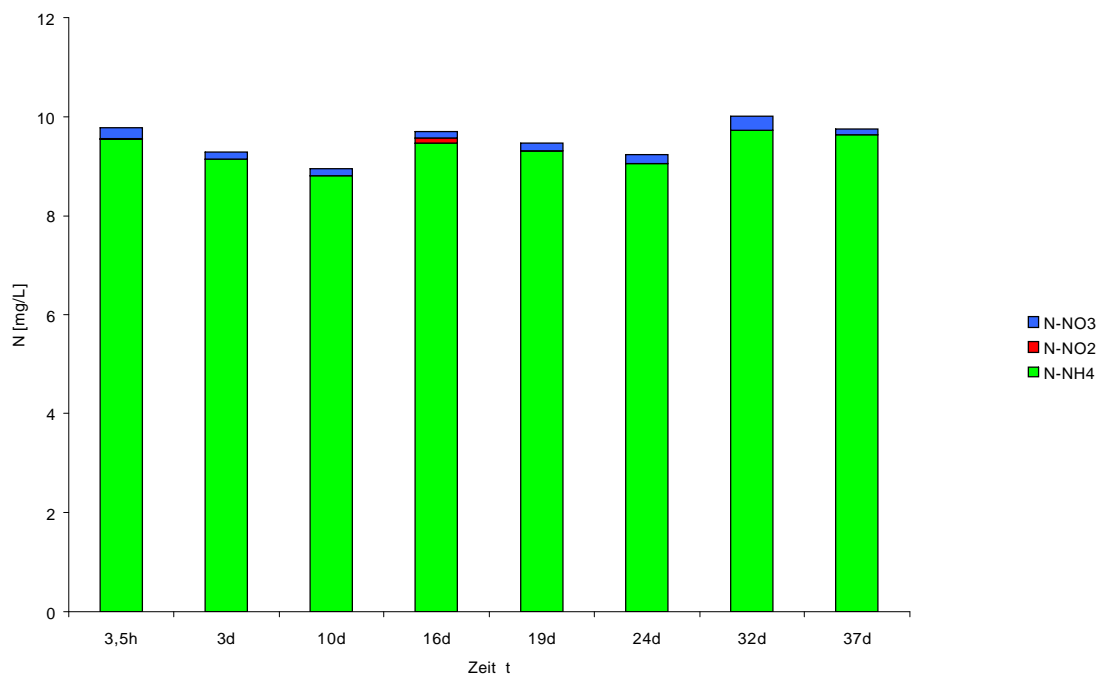


Abb.183 Zulaufwerte der untersuchten Stickstoffverbindungen. Der Stickstoff liegt fast quantitativ als Ammonium (Rest: Nitrat) vor.

Die Stickstoffwerte erlauben eine noch bessere Abschätzung der Einsetzbarkeit der natürlich-biologischen Entmanganung für das getestete Mineralwasser, denn ungünstige Werte für Nitrat und vor allem für Nitrit könnten zum Ausschlusskriterium für diesen Testansatz werden. In den Abbildungen 183-188 ist der aus den Summen der stickstoffhaltigen Ionen Ammonium, Nitrit und Nitrat ermittelte Gesamt-anorganische Stickstoff (GAS) gegen die Zeit aufgetragen, sowie die Verteilung der einzelnen Ionen am GAS. Hier zeigt sich in Abb. 184 zunächst die Stabilität der Zulaufwerte in die Testanlage. Der eingetragene anorganische Stickstoff ist fast ausschließlich in Ammonium gebunden, sowie in geringen Mengen Nitrat. Nitrit ist praktisch nicht nachweisbar. Im Ablauf der ersten Testsäule, die zur Entfernung des restlichen Eisens dienen soll, verschiebt sich die Verteilung des GAS geringfügig hin zum Nitrat, es liegen bei großen Schwankungen bis zu 2,5mg/L N-NO₃ vor (vgl. Abb. 184). Nitrit spielt auch in dieser Teststufe nahezu keine Rolle. Nach der folgenden Belüftung in Anlagenteil 5 ist die Nitrifizierung, also die Oxidation des Ammonium über Nitrit zum Nitrat geplant. Tatsächlich wird der Anteil des Nitrates im Ablauf dieser Testsäule größer und erreicht Werte von bis zu 6mg/L N-NO₃.

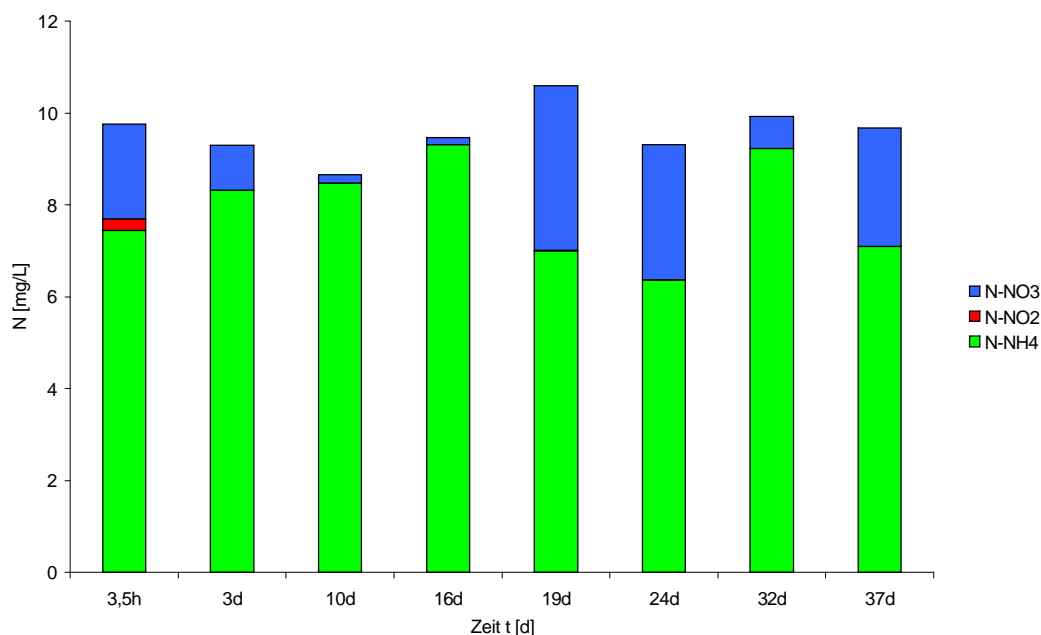


Abb. 184 Stickstoffverbindungen nach der ersten Säule der Testanlage, der geplanten „Restenteisung“. Es überwiegt weiterhin das Ammonium, jedoch wird der Anteil des Nitrats deutlich höher (bis 2mg/L N-NO₃) – beginnende Nitrifikation

Die Werte für Nitrit steigen allerdings in dieser intermediären Stufe ebenfalls deutlich an. Zu Beginn der Untersuchungen liegen sie bei ca. 2mg/L N-NO₂. Bis zum Ende der Untersuchungen nach 37d sinken sie auf ca. 0,3mg/L ab (vgl. Abb. 185).

Im Ablauf der ersten mit Isolat Th beimpften reinen Entmanganungssäule (Anlagenteil 6) tritt das Nitrit wieder in den Hintergrund. Tendenziell nimmt hier der Anteil des Nitrat-Stickstoffs am GAS zu (von ca. 3mg/L nach 3d auf 6-8 mg/L nach 24d und 32d).

Das Nitrit ist zu Beginn der Messungen mit 2mg/L noch deutlich präsent, ist in der Folge aber nicht mehr nachweisbar und tritt erst gegen Ende der Untersuchungen mit ca. 1mg/L N-NO₂ wieder in Erscheinung. Dennoch ist bereits in dieser ersten Entmanganungsstufe neben der Umsetzung des ManganII auch eine deutliche Verringerung der Nitritkonzentration zu verzeichnen (vgl. Abb. 186).

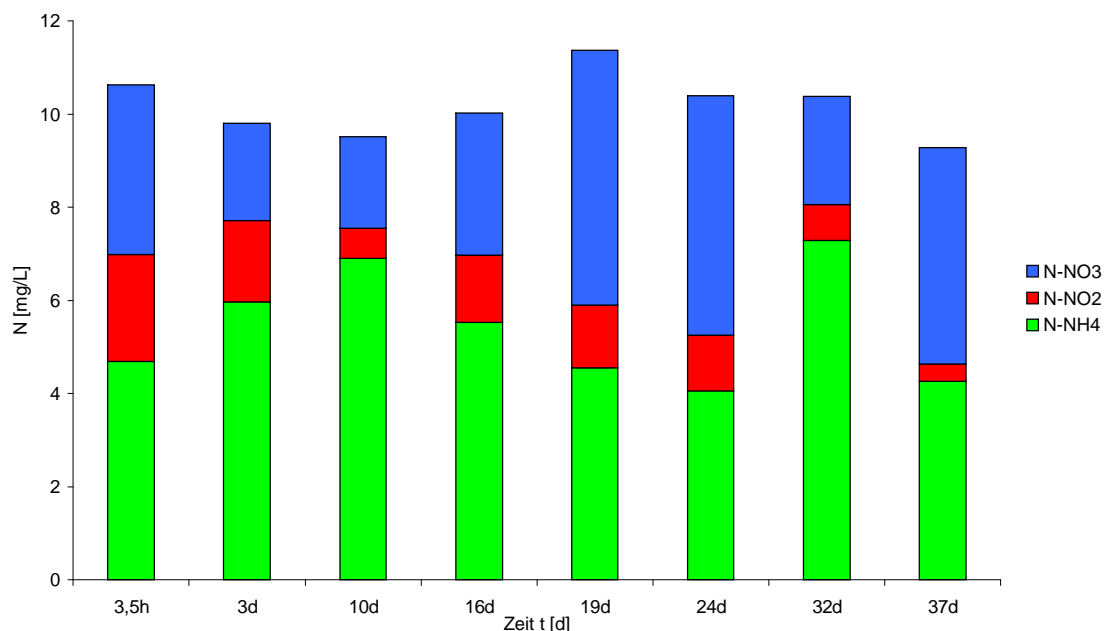


Abb. 185 Stickstoffverbindungen nach der geplanten Nitrifizierung. Es überwiegt Ammonium, jedoch wird der Anteil des Nitrat deutlich höher (ca. 2-4mg/L N-NO₃). Zusätzlich sind erhebliche Mengen Nitrit messbar. Die Nitritkonzentration nimmt aber mit der Zeit sukzessive ab.(von ca. 2mg/L auf ca. 0,4 mg/L (N-NO₂))

Der Ablauf der zweiten mit Isolat Th beimpfte Testsäule zeigt noch deutlicher die erfolgreiche Umsetzung des im Zulaufwassers zur Entmanganung vorhandenen

Nitrits. Lediglich bei der ersten Messung nach 3d Durchflussbetrieb tritt Nitrit mit ca. 1,5mg/L N-NO₂ noch in nennenswerter Größe auf. Im weiteren Verlauf ist es nicht mehr nachweisbar. Der Anteil des Nitrats wird hingegen größer und tendiert gegen Ende der Untersuchungen gegen 10mg/L N-NO₃. Damit wäre die „Gefahr“ einer Nitritbildung im weiteren Verlauf der Aufarbeitung (etwa im Aktivkohlefilter zur Organikeliminierung) nicht länger gegeben, da Nitrat unter den gegebenen Bedingungen äußerst stabil ist (vgl. Abb. 187).

Im Ablauf der unbeimpften Kontrolle tritt unter Schwankungen das Nitrit auch etwas zurück. Von 1,5 mg/L N-NO₂ zu Beginn der Untersuchungen sinken die Werte unter die Bestimmungsgrenze. Die Ammoniumwerte tendieren hier dagegen nicht gegen null, so dass intermediär auch wieder Nitrit im Ablauf der Testsäule nachweisbar ist (vgl. Abb. 188).

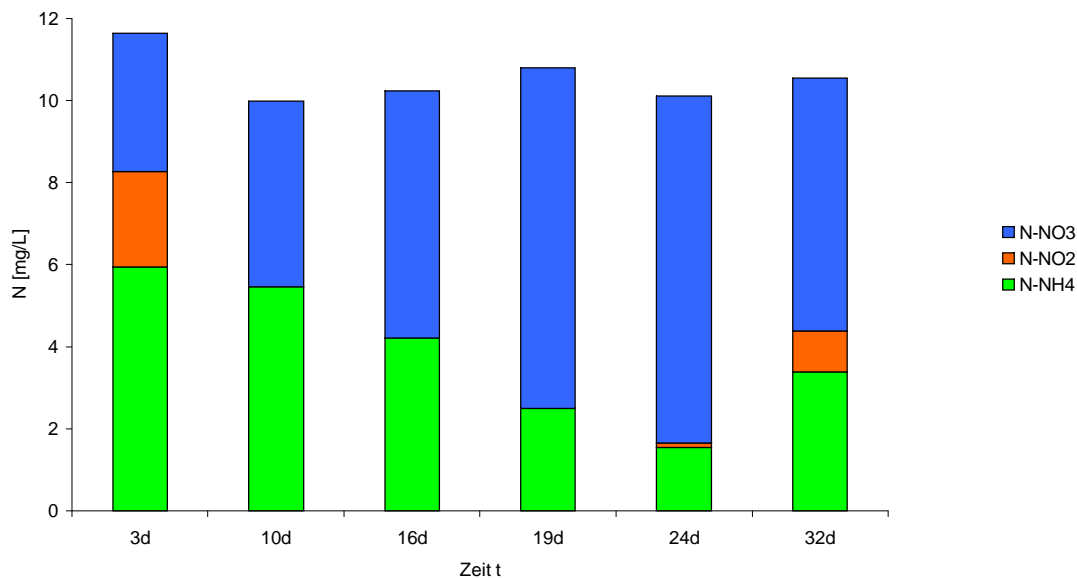


Abb. 186 Konzentration der Stickstoffverbindungen im Ablauf der ersten mit dem Isolat Th beimpften Säule. Nitrit tritt nur partiell auf und geht im Vergleich zum vorherigen Teil der Testanlage deutlich zurück.

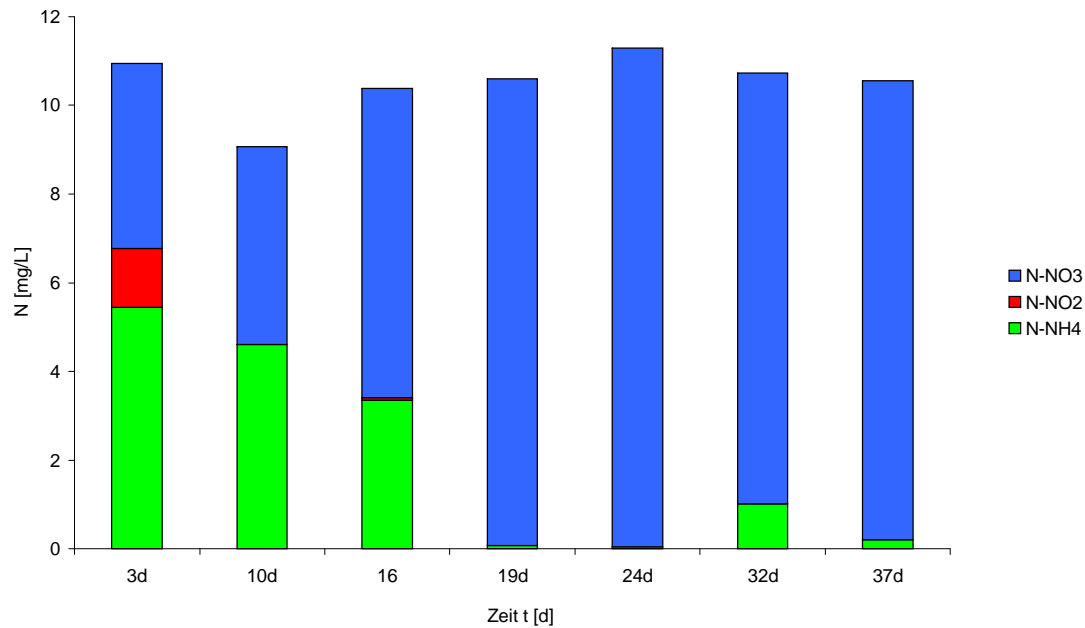


Abb. 187 Stickstoffverbindungen im Ablauf der zweiten der mit dem Isolat Th beimpften Testsäulen. Nitrit ist nur zu Beginn der Testphase nennenswert im Ablauf vorhanden. Ammonium nimmt über den Testverlauf deutlich ab. Der Stickstoff ist zu überwiegenden Teilen zu Nitrat oxidiert.

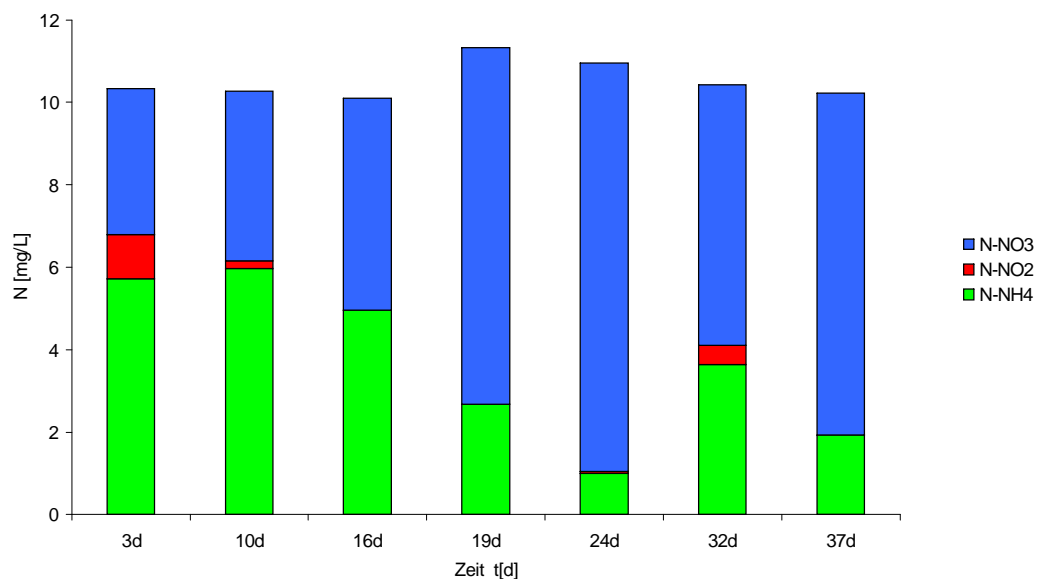


Abb. 188 Stickstoffverbindungen im Ablauf der unbeimpften Kontrollsäule. Auch hier tritt Nitrit nur partiell in Erscheinung (Messtage 3, 10 und 32). Die Anteile des als Nitrat vorkommenden anorganischen Stickstoffs nehmen über die Zeit deutlich zu.

Der Einsatz des Isolats Th als Starterkultur im Testbetrieb für die Entmanganung eines Mineralbrunnenwassers bringt bereits nach einer Zeit von 3,5h Ablaufwerte für ManganII, die im Bereich des Grenzwertes der TVO und des angestrebten Richtwertes der MTV liegen. Unmittelbar nach Inbetriebnahme treten im Ablaufwasser noch deutliche Mengen Nitrit auf. Nach wenigen Tagen sinken diese Werte im Ablaufwasser unter die Nachweisgrenze. Die Werte bleiben im Testverlauf (37d) konstant.

Verschiebungen gibt es lediglich im Verhältnis zwischen Ammonium und Nitrat. Der Ammoniumgehalt im Ablaufwasser sinkt kontinuierlich, während der Nitratgehalt steigt.

Der Ansatz zeigt, dass auch unter den Bedingungen eines eher komplexen Mineral-Rohwassers der Einsatz von Starterkulturen zur Entmanganung möglich ist. Das gewählte Isolat Th ist der autochthonen Mikroflora nahe. Die Entmanganungsgeschwindigkeit (Erreichen des Grenzwertes für MnII nach 3,5h) zeigt die Leistungsfähigkeit des Isolats im gewählten Habitat. Die nahezu vollständige Umsetzung des Ammoniums zu Nitrat verhindert weiteres Auftreten von Nitrit. Der weitere Einsatz von Starterkulturen wäre dann erst nach geraumer Zeit notwendig. Der Zeitraum einer Einarbeitung bis zur kompletten Nitrifizierung wäre dann vertretbar.

4. Diskussion

4.1 Die lebensmittelrechtliche Problematik von ManganII im Mineralwasser und die Folgen

Das Ziel der vorgelegten Arbeit sind **grundsätzliche Untersuchungen** zum Einsatz manganoxidierender Mikroorganismen als Starterkulturen für die ozonfreie natürlich-biologische Entmanganung von Mineralwässern. Diese weisen im Vergleich zu „normalem“ Wasser nicht nur physikalisch-chemisch, sondern auch lebensmittelrechtlich spezielle Voraussetzungen auf (vgl.1.3) und sind daher auch anders zu behandeln.

Der Einsatz von Starterkulturen für die mikrobielle Manganoxidation für die Entmanganung natürlicher Mineralwässer kann aus vielen Gründen vorteilhaft sein:

a) **EisenII und ManganII müssen** aus optischen und geschmacklichen Gründen **aus Mineralwässern entfernt werden**, da rotbraune oder schwarze Ausfällungen die Wässer praktisch unverkäuflich machen würden.

Es bilden sich bei Nichtentfernung Ausfällungen auch im Produktionsbetrieb (Pumpen, Rohrleitungen, Abfüllanlagen), die zwangsläufig zu Störungen führen.

b) Bei derzeitiger Technik werden die Enteisungsfilter nicht als Tiefen- sondern als Flächenfilter genutzt, was zu sehr kurzen Rückspülintervallen und damit hohen Kosten führt.

c) Die Technik der Manganoxidation durch Ozon ist sehr kostenintensiv.

d) Der Einsatz von Ozon ist nach Umsetzung der Richtlinie 96/70EG in nationales Recht deklarierungspflichtig. **Es muss** im Anschluss an die Umsetzung **mit einer stark reduzierten Verbraucherakzeptanz gerechnet werden**.

e) Bei ammoniumhaltigen Wässern treten häufig Probleme mit der Bildung von Nitrit im Produktionsablauf auf. Die betroffenen Abschnitte (Enteisungs- und Entmanganungsfilter, sowie die Aktivkohleeinheit zur Entfernung überschüssigen Ozons müssen daher zum Teil mehrfach in der Woche auf über 80°C erhitzt werden.

f) **Die Einarbeitungszeit von Schnellfiltern zur Entmanganung mit der autochthonen Mikroflora dauert in der Regel mehrere Wochen bis Monate**

und ist damit aus Kostengründen für die Mineralwasserindustrie nicht praktikabel.

Die Einhaltung der lebensmittelrechtlichen Vorgaben (vgl. 1.3.1) ist bei der Etablierung einer mikrobiellen Manganentfernung als „Conditio sine qua non“ zu betrachten. Dabei ist nicht nur die Einhaltung rechtlicher Grenzwertvorgaben, sondern auch die Definition des Natürlichen Mineralwassers als ein Produkt von **„ursprünglicher Reinheit“ entscheidend**. Dies bedeutet, dass Manipulationen der Wässern im Zuge der Aufbereitung auf ein Minimum beschränkt bleiben müssen. So schließen sich unter anderem der Einsatz brunnenfremder Mikroorganismen zur Entmanganung, aktive pH-Veränderungen oder aktive Veränderungen der Wassertemperatur aus.

Grundlegende Untersuchungen zum Einsatz manganoxidierender Mikroorganismen sind unabdingbar, da Einschätzungen über das Verhalten von Manganoxidierern in Mineralwässern gegenüber den speziellen physiko-chemischen Bedingungen kaum vorliegen.

4.2 Entwicklung eines Zweiphasenmediums als Grundlage für physiologische Untersuchungen an manganoxidierenden Mikroorganismen

Im Verlauf der Anreicherungsversuche zeigt sich bereits sehr deutlich, wie empfindlich die manganoxidierenden Systeme einiger Mikroorganismen auf die Milieubedingungen reagieren. Die unter 3.6.1 und 3.6.2 dargestellten Festmedienuntersuchungen belegen zunächst rein qualitativ, dass ein konkreter, je nach Isolat variierender Einfluss der Milieubedingungen auf die Manganoxidentsysteme vorliegt.

Zur genauen Charakterisierung dieser Einflüsse mussten quantitative physiologische Untersuchungen angestrebt werden, denn ohne eine genaue Kenntnis der auf die Manganoxidation bezogenen physiologischen Eigenschaften der untersuchten Isolate ist eine Einschätzung der Eignung als Starterkultur für die Entmanganung nicht möglich.

Physiologische Untersuchungen an manganoxidierenden Bakterien sind in der Vergangenheit nur selten durchgeführt worden. Dies lag oft an fehlenden Reinkulturen, mangelndem Interesse oder anderen thematischen Schwerpunkten der Arbeiten [z.B. BROUWERS ET AL. 1999]. Möglicherweise scheiterten sie aber auch an einem Phänomen, welches in dieser Arbeit auftrat. Eine große Anzahl der vorliegenden Isolate zeigte in Vorversuchen eine Manganoxidation auf festen Medien. **Beim Wechsel zu Flüssigkulturen blieb die Manganoxidation aus, ließ sich aber durch Rückimpfen auf Festmedien problemlos wieder induzieren** (vgl. 3.5, 3.8 und 3.9.8). Diese Eigenart betraf viele Kapselbildner, aber in kein Isolat der Gattung Leptothrix.

Ohne Auflösung dieses Problems ist eine substantielle physiologische Grundlagenuntersuchung der Isolate nicht denkbar. Eine Quantifizierung der Manganoxidation auf Festmedien konnte nicht reproduzierbar eingeführt werden (vgl. 3.6–3.8). Erst **der Einsatz eines Zweiphasenmediums**, d.h. einer agarhaltigen Flüssigkultur **führte zu der erforderlichen reproduzierbaren Manganoxidationen aller getesteten Isolate**. Der Einfluss der zweiten eingesetzten Phase wird auch im weiteren Verlauf der physiologischen Untersuchungen über den Einfluss der Agarkonzentration auf die Manganoxidation deutlich (vgl. 3.9.8). Ein positiver Einfluss der zweiten Phase im Flüssigmedium wird bei allen Isolaten deutlich, doch der Einsatz der zweiten Phase **ermöglicht** für eine große Anzahl manganoxidierender kapselbildender Isolate **erst die physiologischen Untersuchungen**, da ohne Zugabe die Manganoxidation völlig ausbleibt.

Der ermittelte Einfluss der Agarzugabe ins Medium kann nicht auf die reine Vergrößerung der zur Verfügung stehenden Oberfläche reduziert werden, da vergleichbare Untersuchungen mit inerten Materialien (Quarzkies oder Glasperlen) keine vergleichbaren Effekte zeigten. Auch der Einfluss des Verfestigungsmittels Wasserglas (vgl. 3.9.9) zeigt nicht den gewünschten Effekt sondern eine deutliche Hemmung der Manganoxidation schon bei niedrigen Konzentrationen. Die Aktivität der silikatischen Oberflächen und deren Fähigkeit zur Bindung, bzw. zu Adsorption von Schwermetallionen (z.B. CuII) könnten hierfür die Ursache sein.

Die Problematik, dass nicht-scheidenbildende Manganoxidierer bei nicht vorhandener Adhäsion an Oberflächen in flüssigen Habitaten keine Manganoxidation zeigen, wird auch im Testbetrieb der **Isolate KIN und D1 deutlich. Beide Isolate werden im Kreislaufbetrieb zur Präparation der Festbettreaktoren zur Entmanganung nicht immobilisiert** (vgl. 3.10.1.3). Hier besteht noch deutlicher Untersuchungsbedarf, denn es kann nicht von einem generellen Vorkommen der leichter zu immobilisierenden scheidenbildenden Manganoxidierer ausgegangen werden.

Die lange Einarbeitungszeit von Festbettreaktoren zur Manganoxidation kann möglicherweise mit der spärlichen Immobilisierung kapselbildender Manganoxidierer erklärt werden.

Durch die Einführung des Zweiphasenmediums konnten reproduzierbar physiologische Untersuchungen an den manganoxidierenden Isolaten durchgeführt werden.

4.3 Die physiologische Diversität der biologischen Manganoxidation und die Konsequenzen für die Anwendung der mikrobiologischen Manganoxidation in der Mineralwasseraufbereitung

Bisherige Untersuchungen an manganoxidierenden Bakterien gaben in der Regel Optima für die natürlich-biologische Manganoxidation in folgenden Bereichen an:

- vollständige Sauerstoffsättigung, bzw. hohe Sauerstoffkonzentrationen (über 5mg/L) [z.B. MOUCHET 1992];
- pH-Wert zwischen 7,5 und 7,8 [z.B. MOUCHET 1992 UND GAGE ET AL. 2001]
- mesothermer Temperaturbereich [z.B. KINZINGER 1987 ODER ADAMS 1986]

Einige Autoren geben für ihre Isolate aber auch niedrigere pH-Optima an [LARSEN ET AL. 1999 BZW. BROMFIELD 1978]. Das Postulat von Mouchet eines hohen pH-Wertes (7,5-7,8) als Voraussetzung für eine optimale mikrobiologische Manganoxidation in Festbettreaktoren wird von den Ergebnissen beider Autoren nicht unterstützt und lässt sich auch bei den hier untersuchten Isolaten nicht bestätigen. **Alle fünf Isolate zeigen eine optimale Manganoxidation bereits bei einem pH-Wert von 6,5-7,0. Höhere Werte hemmen oder verzögern (vgl. 3.9.1) die Manganoxidation.** Dies wird besonders bei Isolat L1 augenfällig (vgl. Abb. 37). Die

ermittelten pH-Optima decken sich mit den pH-Werten der natürlichen Habitate der untersuchten Stämme (3.9.1). Die These von Mouchet ist also nicht auf alle manganoxidierenden Mikroorganismen, und insbesondere nicht auf die untersuchten Isolate anzuwenden.

Für die optimale Temperatur geben die Autoren Werte von meist deutlich über 20°C an. Für die technische Umsetzung der Entmanganung von Mineral-Rohwässern ist es aber unverzichtbar, dass die Manganoxidation schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen einsetzt, da die geförderten Wässer oft Temperaturen von unter 10°C aufweisen. Diese Voraussetzung wird von den Isolaten R4 und Th gut erfüllt, deren Manganoxidation bereits bei 4°C einsetzt. Beide Isolate zeigen eine klar ausgeprägte **Psychrotoleranz bezüglich der Manganoxidation.**

Im Bereich der vollständigen Sauerstoffsättigung sehen die meisten Autoren die optimalen Bedingungen für die Manganoxidation. Mouchet [MOUCHET 1992] gibt über 5mg/L als optimal für die Entmanganung in Festbettreaktoren an. Auch hier zeigt sich in der Untersuchung der fünf Isolate, dass die für die Manganoxidation optimalen Werte schon deutlich darunter, etwa bei 10% Sättigung beginnen, also im microaeroben Bereich. Die Entmanganungsleistung fällt zum Bereich der vollständigen Sättigung nur geringfügig ab, so dass für eine technische Umsetzung die vollständige Sättigung durch Belüftung zu bevorzugen wäre, um ein Ausbleiben der Manganoxidation durch ungewollte partielle Anaerobisierungen zu vermeiden.

Für einige Spezies der Gattung *Siderocapsa* postulieren einige Autoren aber auch schon früher Mikroaerophilie, wie Hanert [HANERT 1981] zusammenfassend ausführt. Bray [BRAY ET AL. 2001] führt aus, dass nur eine länger anhaltende Verringerung der Sauerstoffkonzentration (unter 2mg/L) die Manganoxidation beeinträchtigt.

Mouchets Begründung für den notwendigen pH-Anstieg liegt im Stabilitätsdiagramm für Mangan (vgl. Abb. 1 und 188), wonach ein steigender pH-Wert und ein steigendes Redoxpotential die chemische Manganoxidation und, so seine Schlussfolgerung, auch die natürlich-biologische Manganoxidation begünstigen.

Messungen des Redoxpotentials in den gepufferten Batch-Kulturen (nicht dargestellte Werte) sowie in den Testanlagen (vgl. 3.10.1 und 3.10.2) ergaben nach dem Beimpfen tendenziell steigende Redoxpotentiale und in den Testanlagen (durch Austreiben gelösten Kohlenstoffdioxids bei der Belüftung) auch steigende pH-Werte. Die Redoxpotentiale in den Batch-Kulturen lagen in allen Messungen zwischen 420 und 450mV (vgl. Abb. 189). Damit ergeben sich für die getesteten Isolate Oxidationsfenster für die Manganoxidation, die weit in den stabilen Bereich des ManganII-Ions im Stabilitätsdiagramm hineinreichen. Eine Anhebung des pH-Wertes und des Redoxpotentials ist daher für die getesteten Isolate nicht notwendig.

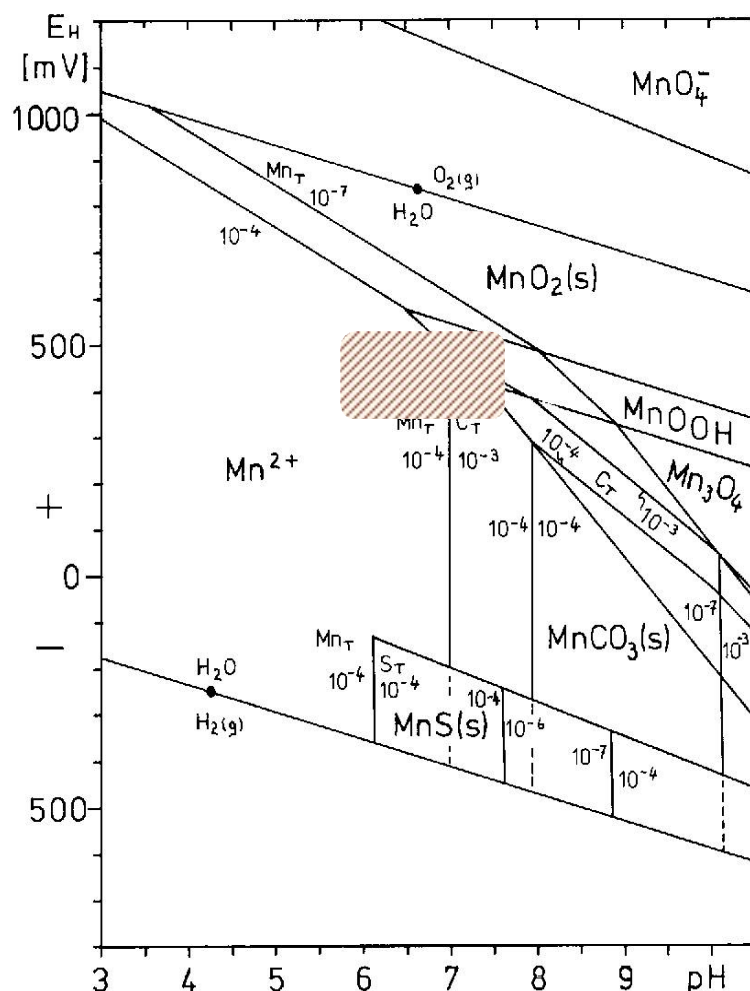


Abb. 188 Eh – pH- Diagramm System Mn – H₂O – CO₂ – H₂S (vgl. Abb.1). Die braunmarkierte Fläche zeigt den Bereich an, in dem bei den untersuchten Isolaten eine Manganoxidation stattfand [mod. Nach HEM 1963]

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die physiologische Diversität der mikrobiologischen Manganoxidation ein weit größeres Spektrum umfasst, als bislang angenommen. Die natürlich-biologische Manganoxidation ist bereits bei Milieubedingungen durchführbar, bei denen die chemische Stabilität des ManganII-Ions gewährleistet ist. Sie ist also nicht, wie bislang oft angenommen, auf den direkten Grenzbereich der ManganII-Stabilität beschränkt. Eine aufwändige Beeinflussung der Rohwässer, etwa durch Entfernen des gelösten Kohlenstoffdioxids oder eine Temperaturanhebung ist für das Erreichen einer mikrobiellen Manganoxidation nicht notwendig.

Einer Nutzung der mikrobiologischen Manganoxidation steht auch für die sauren und kalten Wässern der Mineralwasserindustrie nichts im Wege.

4.4 Erkenntnisse zum Einfluss weiterer Faktoren auf die Manganoxidation: Der Einfluss von Salinität, Spurenelementen, und Kupfer

Eine Reihe von Abhängigkeiten der Manganoxidation wurden untersucht, die für die technische Umsetzung der mikrobiologischen Manganoxidation in Mineral-Rohwässern sowie die Kultivierung von manganoxidierenden Mikroorganismen von mitentscheidender Bedeutung sind.

Für den technischen Einsatz sind Parameter wie Salinität, Spurenelementkonzentration oder KupferII-Konzentration zu beachten. Allen diesen Parametern ist gemein, dass sie in übermäßigen Konzentrationen die Manganoxidation hemmen. In geringeren Konzentrationen können sie die Manganoxidation aber nicht unerheblich fördern (vgl. 3.9.4 – 3.9.6). Die hemmende Wirkung tritt bei Konzentrationen auf, die noch keine lebensmittelrechtlichen Konsequenzen aufgrund vorgegebener Grenzwerte oder toxikologischer Problematiken nach sich ziehen würden.

Bezüglich des wichtigen Einflusses von CuII auf die Manganoxidation sind die Untersuchungen von Brouwers [BROUWERS ET AL. 1999] bestätigt. Der positive Einfluss von CuII-Ionen auf die Manganoxidation wird bei allen getesteten Isolaten deutlich.

Hemmende Wirkungen durch CuII sind schon bei Konzentrationen von 10 µmol/L (entspricht ca. 0,6 mg/L) zu beobachten. Legt man den Grenzwert der TWV

zugrunde (Ein Grenzwert für Kupfer im Mineralwasser tritt 2006 in Kraft), wäre eine solche Konzentration lebensmittelrechtlich nicht zu beanstanden.

Ähnliches gilt für die Salinität. Auch hier können für Mineralwässer übliche bzw. mögliche Ionenkonzentrationen von über 1000mg/L die Manganoxidation bereits deutlich negativ beeinflussen (vgl. 3.9.4). Boogerd [BOOGERD 1986] beschreibt für *Leptothrix discophora* einen hemmenden Effekt, den Natriumchlorid auf die Manganoxidation ausübt. Die von Boogerd genutzten niedrigsten Kochsalzkonzentrationen liegen jedoch mit Werten über 0,1 mol/L (entspricht ca. 5800 mg/L) bereits weit über den hier verwendeten Konzentrationen.

Auch komplexe Spurenelementgemische im Wasser können unter humantoxikologisch oder lebensmittelrechtlich relevanten Konzentrationen die Manganoxidation verzögern oder hemmen.

Die Einflüsse, die auf die manganoxidierenden Systeme der entsprechenden Mikroorganismen wirken, sind offenbar weit vielschichtiger, als bislang angenommen. Die Kenntnis der Parameter pH, Redoxpotential, Sauerstoff und Temperatur reicht für die Beschreibung des Potentials einer mikrobiellen Manganoxidation bei weitem nicht aus.

Es kommen mit der Salinität, der Spurenelementkonzentration und insbesondere der CuII-Konzentration weitere wichtige Parameter hinzu. Die positiven, wie negativen Beeinflussungen der Manganoxidation durch diese Parameter treten in Konzentrationsbereichen auf, wie sie in Mineralwässern nicht selten anzutreffen sind. Insbesondere die Isolate R4 und KIN weisen eine ausgeprägte Toleranz diesen Parametern gegenüber auf. Hohe Salinitäten oder Spurenelementkonzentrationen bedeuten also nicht generell eine ungünstige Prognose für eine mikrobielle Manganoxidation.

Es muss sicherlich davon ausgegangen werden, dass die jeweilige autochthone Mikroflora durch eine entsprechende Adaption in der technischen Umsetzung weniger anfällig für die Auswirkungen der entsprechenden Parameter wären. Dennoch kann

in den hier untersuchten Parametern **ein Schlüssel für die vielen vergeblichen Versuche innerhalb der Mineralwasserindustrie liegen, eine mikrobiologische Manganoxidation in kurzer Zeit zu etablieren.**

Den entsprechenden Parametern – insbesondere den Spurenelementen – ist bei der technischen Umsetzung der mikrobiologischen Manganoxidation in der Vergangenheit nur wenig Beachtung geschenkt worden. Insbesondere im Mineralwasserrecht gibt es für Spurenelemente bislang nur bei deutlicher toxikologischer Relevanz (z.B. bei Blei oder Quecksilber) Grenzwertvorgaben. Unempfindliche Stämme könnten universell einsetzbare Starterkulturen sein, die Bemühungen zur Isolierung aus den zu reinigenden Wässern könnte sich in der Methodik auf derartige Stämme konzentrieren.

4.5 Die Bedeutung der extrazellulären polymeren Substanz (EPS) für die Manganoxidation

Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) spielen in Vorgängen der mikrobiellen Eisen- und Manganoxidation eine zentrale Rolle [z.B. CZEKALLA ET AL. 1985]. So bilden Arten der Gattung *Leptothrix* Scheidenmaterial oder Haftscheiben, an denen die Manganoxidation abläuft, *Siderocapsaceen* bilden Kapselmateriale aus und andere Organismen amorphes Schleimmateriale.

Das gilt entsprechend für die hier untersuchten Isolate. Die Isolate Th und R4 bilden Scheidenmateriale (vgl. u.a. Abb. 106-107 und 143), die Isolate L1 und R4 Haftscheiben (vgl. u.a. Abb.138-139 und 143). Die Manganoxidation der Isolate D1 und KIN erfolgt an amorphem bis kapsulären Materiale (vgl. u.a. Abb. 122/123 und 97/98). Die Manganoxidationsprozesse sind offensichtlich bei allen Isolaten and EPS gebunden. Auch die isolierten, manganoxidierenden Hefen (vgl. Abb. 9-11 und Nr. 3.2.7) bilden Schleime aus, an denen die Manganoxidation abläuft. Wie sehr die Fähigkeit zur Manganoxidation von EPS abhängt, wird in den physiologischen Untersuchungen der Manganoxidierer deutlich. Das Ausbleiben der Bildung der EPS bei den entsprechenden Milieubedingungen geht in allen Fällen mit dem Ausbleiben der Manganoxidation einher (vgl. Abb.: 46-48, 52-53, 80-83, 87-89, 97-99, 101-103,

112-113 und 122-123). **Das Fehlen der Scheiden- und Kapselbildung, bzw. der EPS-Bildung führt zum Ausbleiben der Manganoxidation.**

Dies steht nicht zwangsläufig mit fehlendem Wachstum oder Biomasseproduktion in Verbindung und ist möglicherweise als eigenständige wachstumsunabhängige Eigenschaft manganoxidierender Mikroorganismen anzusehen.

4.6 Konsequenzen aus der physiologischen Diversität für Vorstellungen aus der Artenmannigfaltigkeit bei Manganoxidierern

Einige der hier untersuchten Isolate konnte nur mit Mühe in die Taxonomie der bekannten Manganoxidierer eingruppiert werden, andere gar nicht. Auch für die Vertreter der Gattung *Leptothrix* ist die vorgenommene Klassifizierung nicht als endgültig zu betrachten. Das Isolat R4 kann gemäß Spring [SPRING 2002] als *Leptothrix lopholea* identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der klassischen Literatur z.B. von Cholodny [CHOLODNY 1926] wird das Isolat als „*Leptothrix crassa*“ (späterer Name *L. discophora*) und gemäß Beger [BEGER 1937] als *Leptothrix echinata* eingeordnet.

Ähnliches gilt für Isolat L1, dass gemäß Spring als *Leptothrix discophora* klassifiziert wurde. Nach Cholodny [CHOLODNY 1926] wäre auch eine Klassifizierung als *Leptothrix sideropous* möglich.

Die Klassifizierung des Isolats D1 aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale führt ebenfalls nicht zu einem eindeutigen Ergebnis. Die manganoxidierenden Hefen sind bislang nicht beschrieben worden und werden daher ebenfalls nicht eingruppiert.

In den letzten Jahrzehnten haben sich die Untersuchungen manganoxidierender Mikroorganismen auf zwei Hauptaspekte konzentriert:

1. Die technische Nutzung manganoxidierender Mikroorganismen zu mikrobiologischen Entmanganung [u.a. Arbeiten von CZEKALLA UND MOUCHET];
2. Die genetischen und enzymatischen Grundlagen mikrobieller Manganoxidation, insbesondere von *Leptothrix discophora* [u.a. diverse Arbeiten von ADAMS/GHIORSE];

Die ökologische Diversität mikrobieller Manganoxidierer ist in der Vergangenheit nur wenig untersucht worden. Die Arbeiten der Autoren aus der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts [z.B. DORFF 1934, BEGER 1937, CHOLODNY 1926) wurden kaum weitergeführt, so dass kaum gesicherte Erkenntnisse über die ökologische Diversität manganoxidierender Mikroorganismen oder Vergleichsorganismen in Stammsammlungen vorliegen. Die Klassifizierung manganoxidierender Mikroorganismen aufgrund physiologischer und morphologischer Merkmale verläuft daher nicht immer problemlos. Hanert [HANERT 1981] stellte bereits 1981 fest, dass eine taxonomische Eingruppierung der Arten der Gattung *Siderocapsa* noch einer endgültigen Untersuchung bedarf. An diesem Zustand hat sich bis heute, mit Ausnahme einiger weniger Korrekturen [CHUN ET AL. 2001] nichts geändert.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit und die Isolierung von 18 manganoxidierenden Isolaten lassen den Schluss zu, **dass die biologische Diversität manganoxidierender Mikroorganismen weit größer ist, als zur Zeit in der gängigen Literatur angegeben.** Dafür sprechen zum einen die isolierten manganoxidierenden Hefen, zum anderen vier Isolate der Gattung *Leptothrix*, von denen nur Isolat Th zweifelsfrei klassifiziert werden konnte.

Diese große Diversität manganoxidierender Mikroorganismen führt zum einen dazu, dass an der Stelle der Isolierung und vor allem der Klassifizierung eisen- und manganoxidierender Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen *Leptothrix*, *Siderococcus* und *Siderocapsa* noch erheblicher Untersuchungsbedarf besteht. Zum anderen bietet eine hohe biologische Diversität erheblich **höhere Chancen auf eine Nutzung manganoxidierender Mikroorganismen** in verschiedenen manganhaltigen Wässern bzw. Habitaten. Saure Wässer sind dabei ebenso wenig ausgenommen, wie stark salzhaltige, schwermetallhaltige oder organikreiche Wässer.

4.7 Mögliche Nutzung der biologischen Manganoxidation mit Starterkulturen auch für schwierige (ammonium- und huminstoffreiche) Mineralwässer

Die Nutzung manganoxidierender Mikroorganismen für die Aufbereitung von Trinkwässern ist bereits in vielen Betrieben etabliert. Die hier verwendeten Wässer zeichnen sich in der Regel durch eine niedrige Organikfracht und einen etwa neutralen bis leicht sauren pH-Wert aus. In diesen Betrieben wird die Entmanganung - zum Teil nach Animpfen mit Fremdmaterial – der autochthonen und damit adaptierten Mikroflora des Grundwassers genutzt.

Die Charakteristik von Mineral-Rohwässern ist oft erheblich anders. Diese Wässer kommen oft aus großen Tiefen und sind durch gelöstes Kohlenstoffdioxid oft deutlich sauer. Hinzu kommen erhöhte Konzentrationen gelöster Salze und in speziellen (moorigen) Gebieten sogar noch große Mengen Huminstoffe und Ammonium. Die Vorstellung, dass eine mikrobielle Manganoxidation bevorzugt in pH-Bereichen deutlich über 7,0 abläuft, spräche dann gegen das Vorkommen der bekannten manganoxidierenden Spezies.

Doch schon die physiologischen Untersuchungen der fünf Isolate spricht gegen diese These:

- Die Manganoxidation tritt schon bei pH-Werten von 6,0 auf;
- Es werden Organikkonzentrationen zwischen 0 und 250 mg/L toleriert;
- Der Temperaturbereich der Manganoxidation liegt zwischen 4° und 37°C;
- Salinitäten bis über 3000 mg/L werden von einigen Isolaten toleriert.

Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, **dass manganoxidierende Mikroorganismen in einer erheblich größeren Bandbreite von Habitaten anzutreffen sind, als bislang angenommen.**

Bei der Untersuchung manganhaltiger Habitate, insbesondere manganhaltiger Mineralwässer unterschiedlicher Qualität, konnten in allen manganoxidierende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dies betraf in Vorversuchen sowohl nahezu organikfreie, hydrogencarbonatreiche und mesotherme Tiefenwässer (*Siderocapsa spec.*), und das unter 3.10.2 untersuchte organikreiche und niedrigtemperierte Mineral-Rohwasser (*Leptothrix spec.*, manganoxidierende Hefen, mehrere kapselbildende Spezies). Parallel dazu wurden stets eisenoxidierende Spezies (*Gallionella ferruginea* bzw. *Leptothrix spec.*) nachgewiesen. Trotz der anderen

Grundvoraussetzungen sind manganoxidierende Mikroorganismen also offenbar auch in Mineralwässern weit verbreitet. Die Untersuchungen von Svorcová [SVORCOVÁ 1975] zum Vorkommen manganoxidierender Mikroorganismen in Mineralwässern bestätigen sich damit.

Die Untersuchungen zum Einsatz der Isolate als Starterkulturen in zwei völlig verschiedenen Wässern und die vergleichbar guten Ergebnisse in beiden Habitaten sprechen für die Einsetzbarkeit der mikrobiellen Manganoxidation auch in auf den ersten Blick „schwierigen“ Wässern mit hohen Hydrogencarbonat- und Huminstoffgehalten. Auch die mögliche Problematik hoher Ammoniumkonzentrationen und gesteigerter Konzentrationen von Nitrit und Nitrat stellen für die mikrobielle Manganoxidation kein wesentliches Hindernis dar. Wie aus den unter 3.10.2 dargestellten Untersuchungen hervorgeht, hemmen Ammonium- oder Nitriten die mikrobielle Entmanganung nicht. Bei entsprechender Anlagenkonzeption, insbesondere einer ausreichenden Kontaktzeit im Filter, kann die Nitritproblematik durch eine vollständige Umsetzung zu Nitrat umgangen werden. Für weitergehende Untersuchungen und Arbeiten wäre sogar an den Einsatz einer nachgeschalteten anaeroben Stufe zur Denitrifizierung denkbar.

Das Postulat, nach dem für eine erfolgreiche Manganoxidation zunächst das im Wasser enthaltene Ammonium über Nitrit zu Nitrat umgesetzt sein müsse, kann hier nicht bestätigt werden, denn die Manganoxidation setzt auch bei noch deutlichen Ammoniumgehalten im Prozesswasser ein.

5. Zusammenfassung

1. Aus sechs Habitaten wurden insgesamt **19 manganoxidierende Mikroorganismen als Reinkulturen isoliert**, darunter zwei manganoxidierende Hefen und vier Arten der Gattung *Leptothrix*. Manganoxidierende Mikroorganismen sind offenbar weiter verbreitet und weisen eine größere morphologische Diversität auf, als bislang angenommen.

2. Isolat L1 (*L. discophora*, möglicherweise *L. sideropous*) verliert nach kurzer Zeit der Kultivierung die Fähigkeit zur Scheidenbildung und führt die **Manganoxidation nur an Haftscheiben** durch. Dies ermöglicht vergleichende Untersuchungen der Manganoxidation an Scheidenmaterial und der haftscheibengebundenen Manganoxidation.

3. Kapselbildende Mikroorganismen führen im Batch-Versuch eine Manganoxidation oft erst durch, wenn ihnen ein **Zweiphasenmedium** zur Verfügung gestellt wird, ansonsten bleibt die Manganoxidation aus. Die Auswahl der zweiten Phase ist dabei nicht unwichtig, denn Wasserglas als zweite Phase zeigt deutlich negative Einflüsse auf die Manganoxidation.

Auch im Einsatz in Festbettreaktoren ist die Immobilisierung der untersuchten Kapselbildner nicht optimal. Die Hintergrund-Manganoxidation (hier ausgelöst durch *Metallogenium spec.*) überlagert die zugeimpften Isolate.

4. **Die Abhängigkeit der Manganoxidation vom Organikgehalt bzw. der Mangankonzentration** kann typisiert werden:

- a) die Manganoxidation verläuft um so schneller, je niedriger die Konzentration des organischen Materials bzw. des MnII ist;
- b) die Manganoxidation läuft nahezu unbeeinflusst von der Konzentration des organischen Materials bzw. des MnII ab (großes Oxidationsfenster);
- c) die Manganoxidation findet nur bei spezifischen Konzentrationen des organischen Materials bzw. des MnII statt (kleines Oxidationsfenster)

5. Physiologische Ergebnisse

5.1 Das pH-Optimum der untersuchten Isolate liegt zwischen 6,5 und 7. Die oft genannten Voraussetzungen für eine optimale mikrobiologische Manganoxidation im basischen Bereich (pH über 7,5) lassen sich damit nicht auf die hier untersuchten Isolate anwenden. Deren Manganoxidationsaktivität wird in vielen Fällen bei pH-Werten über 7,5 deutlich gehemmt. Dagegen tritt **eine Manganoxidation schon ab pH6,0 auf**. Eine mikrobiologische Manganoxidation saurer Mineralwässer wird daher nicht durch einen (zu) niedrigen pH-Wert verhindert.

5.2 Die untersuchten Isolate zeigen eine **optimale Manganoxidationsaktivität im microaeroben bis voll aeroben Bereich**. Bei der technischen Umsetzung der mikrobiellen Manganoxidation mit den untersuchten Isolaten sollte aus Gründen der technischen Handhabbarkeit eine vollständige Aerobisierung des Habitats angestrebt werden, um einen Leistungsabfall der Filter durch zu geringe Sauerstoffpartialdrücke zu verhindern.

5.3 Die untersuchten **Isolate haben spezifische Oxidationsfenster bei variierten Organikkonzentrationen**. Die Entmanganung von Mineral-Rohwässern ist daher sowohl für Wässer, die nahezu organikfrei sind, als auch für Wässer mit einer hohen Organikfracht (z.B. aus moorigen Gegenden) denkbar.

5.4 Die Salinität des Mediums hat auf die Manganoxidation der untersuchten Isolate eine mitentscheidende Wirkung. **Bei Salinitäten von über 1000ppm kann es zu Verzögerungen oder Hemmungen der Manganoxidation kommen**. Dies kann bei salzhaltigen Mineralwässern zu Problemen in der Aufarbeitung führen. Einige Isolate tolerieren hingegen selbst hohe Salzfrachten im Wasser.

5.5 Geringe Mengen an **Spurenelementen fördern die Manganoxidation** und die Scheidenbildung einiger Isolate. Eine **zu starke Spurenelementfracht im**

Medium hemmt hingegen die Manganoxidation aller Isolate. Deutlich werden auch hier die Unterschiede zwischen den einzelnen Isolate. Scheidenbildende Manganoxidierer kommen offenbar mit ungünstigen Milieubedingungen tendenziell besser zurecht, als Kapselbildner.

5.6 KupferII stimuliert in Dosen bis 1µmol/L die Manganoxidation. Bei Konzentrationen ab 10µmol/L (ca. 0,6mg/L) zeigen alle Isolate eine Verzögerung oder Hemmung der Manganoxidation. Die Manganoxidationshemmung setzt damit schon bei Konzentrationen ein, die die Verkehrsfähigkeit der Wässer nicht beeinträchtigt. Bei der Auswahl der Starterkulturen ist daher auf den **Einfluss der Kupferkonzentration** auf die Manganoxidation zu achten.

5.7 Viele Isolate zeigen einen **hemmenden Effekt** auf die Manganoxidation **durch überhöhte Mangankonzentrationen.** Einige Isolate (erneut insbesondere scheidenbildende) zeigen hier eine Toleranz, die daran denken lässt, sie auch in ManganII-kontaminierten Wässern (etwa aus Manganerzminen) einzusetzen.

5.8 Das **Temperaturoptimum** der untersuchten Isolate liegt im mesothermen bis leicht psychrophilen Bereich **zwischen 17°C und 25°C.** Bemerkenswert ist die Psychrotoleranz einiger Isolate, die eine **Manganoxidation bereits ab 4°C** durchführen. Da die zu reinigenden Mineral-Rohwässer in der Regel Temperaturen kaum über 10°C aufweisen, sollten bei der Auswahl der Starterkulturen psychrotolerante Organismen bevorzugt werden.

6. Im Rahmen einer Testfiltration eines enteisenen Grundwassers ohne nennenswerte Organik- bzw. Stickstofffrachten wird **innerhalb von 4h (!) der ManganII-Gehalt im Durchflussbetrieb (ca. 1m/h) unter den Grenzwert der TVO gesenkt.** Ohne Einsatz der Starterkulturen beträgt die Einlaufzeit eines derartigen Festbettreaktors mehrere Wochen bis Monate. Die Vorteile, die diese Zeitverkürzung für den Einsatz der mikrobiologischen Entmanganung in der Mineralwasserindustrie hätte, sind offenkundig.

7. Bei der Untersuchung von Mineral-Rohwässern unterschiedlichster Qualität, sind in allen eisen- und manganoxidierende Mikroorganismen erkannt worden. Sie bieten demnach alle das **Potential für eine natürlich-biologische Entmanganung mit brunneneigenen Organismen**. Es wurden sowohl Kapselbildner, als auch Scheidenbildner gefunden, hinzu kommt als eisenoxidierender Organismus *Gallionella ferruginea*.

8. **Eine Testfiltration in einem Mineralbrunnenbetrieb mit organik- und ammoniumreichem Wasser erbringt innerhalb von 3,5h eine Absenkung des ManganII-Gehaltes auf Grenzwertniveau (ca. 0,05mg/L)**. Nach wenigen Tagen Testbetrieb ist im Ablaufwasser der Testanlage kein Nitrit mehr nachweisbar. Das vorhandene Ammonium wird quantitativ zu Nitrat oxidiert. Das Wasser ist damit stabilisiert, d.h. es ist kein Nitritvorkommen im weiteren Prozessverlauf mehr zu erwarten.

9. Der Einsatz von Mikroorganismen bietet für Betriebe der Mineralwasserindustrie eine Reihe von Vorteilen:

1. Kein Einsatz von Ozon, damit keine Deklaration der Ozonbehandlung.
2. Entfernung von FeII und MnII ohne den Einsatz von teuren Ozongeneratoren.
3. Stabilisierung der Wässer durch Oxidation vorhandener Stickstoffverbindungen zu Nitrat.
4. Verkürzung der Einarbeitungszeit der Festbettreaktoren von mehreren Wochen auf wenige Stunden.
5. Der Einsatz manganoxidierender Mikroorganismen für die natürlich-biologische Entmanganung kann in Wässern unterschiedlichster Beschaffenheit durchgeführt werden.

6. Literatur

ADAMS, GHIORSE (1985)

Influence of Manganese on Growth of a Sheathless Strain of *Leptothrix discophora*; Appl. and Environmental Microbiology, Mar. 1985, p. 556-562

ADAMS, GHIORSE (1986)

Physiology and ultrastructure of *Leptothrix discophora* SS-1; Arch Microbiol (1986)145:126-135

ADAMS, GHIORSE (1987)

Characterization of Extracellular Mn^{2+} -Oxidizing Activity and Isolation of an Mn^{2+} -Oxidizing Protein from *Leptothrix discophora* SS-1; J. of Bacteriology (Mar. 1987), 1279-1285

AMTSBLATT DER EU

Richtlinie 96/70EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 28. Oktober 1996 zur Änderung der Richtlinie 80/777/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über die Gewinnung von und den Handel mit natürlichen Mineralwässern

ARCURI, EHRLICH (1980)

A comparison of the cytochrome complements of seven strains of marine manganese-oxidizing bacteria, Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie; Vol. 20; 9/1980; p. 583-586

BARY, OLANCZUK-NEYMAN (2001)

The Influence of Changes in Groundwater composition on the efficiency of manganese and ammonia nitrogen removal on mature quartz sand filtering beds, Water Science and Technology, Water Supply Vol1 No. 2 pp. 91-98, 2001

BAST (1999)

Mikrobiologische Methoden; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 1999

BELITZ, GROSCH (1992)

Lehrbuch der Lebensmittelchemie; 4. Auflage Springer Verlag 1992

BEGER (1937)

Die Eisenbakterien in Wasserversorgungsanlagen und ihre praktische Bedeutung; Das Gas- und Wasserfach; 80. Jg., 1937, Heft 50 S. 886-911

BGW (2004)

Bundesverband-Gas-Wasser – Wasserfakten im Überblick
<http://www.bundesverband-gas-und-wasser.de>

BUNDESGESETZBLATT

Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001
Trinkwasserverordnung i.d.F. vom 25.11.2003; BGBl. I S. 2304

BUNDESGESETZBLATT

Verordnung über natürliches Mineralwasser, Quellwasser und Tafelwasser vom 1. August 1984; i.d.F. vom 24.05.2004; BGBl. I S. 1030

BOOGERD, DE VRIND (1987)

Manganese Oxidation by *Leptothrix discophora* ;
J. of Bacteriology (Feb. 1987), 489-494

BROMFIELD (1978)

The Oxidation of Manganese Ions under Acid Conditions by an Acidophilous
Actinomycete from Acid Soil; Aust. J. Soil Res. 1978; 16; 91-100

BROUWERS, DE VRIND, CORSTJENS, CORNELIS, BAYASSE, DE VRIND-DE JONG (1999)

CumA, a gene encoding a Multicopper Oxidase, Is Involved in Mn^{2+} Oxidation in
Pseudomonas putida GB-1;
Appl. and environmental Microbiology, Apr. 1999, p. 1762-1768

BROUWERS, VIJGENBOOM, CORSTJENS, DE VRIND, DE VRIND-DE JONG (2000)

Bacterial Mn^{2+} Oxidizing systems and Multicopper Oxidases: An Overview of
Mechanisms and Functions;
Geomicrobiology Journal, 17:1-24, 2000

CHOLODNY (1926)

Die Eisenbakterien, Verlag Gustav Fischer Jena, 1926

CHUN, RHEE, HAN, BAE (2001)

Arthrobacter siderocapsulatus Dubinina and Zhdanov 1975^{AL} is a later subjective
synonym of *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895^{AL}: Intern. Journ. of
System. and Evolution. Microbiol. (2001) 51, 169-170

CZEKALLA (1988)

In-Situ-Analyse der physiologischen und filtrationstechnischen Leistung von Eisen- und
Manganbakterien in Schnellfilteranlagen der Trinkwasseraufbereitung; Diss. 1988,
Technische Universität Braunschweig

CZEKALLA, MEVIUS, HANERT (1985)

Quantitative removal of Iron and manganese by microorganisms in rapid sand filters
(In situ investigation); Water Supply, Vol 3, pp. 111-123, 1985

DEPALMA (1993)

Manganese Oxidation by *Pseudomonas putida*, Diss. 1993

DEVIND, DEVIND-DEJONG, DEVOOGT, WESTBROEK, BOOGERD, ROSSON (1986)

Manganese Oxidation by Spore Coats of a marine *Bacillus* Species; Appl. and
environmental Microbiology, Nov. 1986, p. 1096-1100

DORFF (1934)

Die Eisenorganismen. Pflanzenforschung Gustav Fischer Verlag Jena 1934

EHRlich (2000)

Geomicrobiology 3rd Edition, 2000

EMERSON, GHIORSE (1992)

Isolation, Cultural Maintenance, and Taxonomy of a Sheath-Forming Strain of *Leptothrix*
discophora and Characterization of Manganese-Oxidizing Activity Associated with the

Sheath;

Appl. and environmental Microbiology, Jan. 1992, p. 4001-4010

FALBE, REGITZ (HERAUSG.) (1992)

Römpp Chemie Lexikon; 9. erw. und neu bearbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart; 1992

Gage (2001)

Biological Iron and Manganese Removal – Pilot and full Scale Applications; Presented at the Ontario Water Works Association conference, May 3rd, 2001

GEBAUER, A.

Biochemische und physiologische Untersuchungen zur Autotrophie des Eisenbakteriums *Gallionella ferruginea* Ehrenberg, pp. 1-62. Botanisches Institut der Technischen Universität Braunschweig (federal Republic of Germany). Thesis PHD

GHIORSE (1984)

Biology of Iron- And Manganese-Depositing Bacteria; Ann. Rev. Microbiol. 1984, 38:515-550

GIAMMARA, DeVRIES, BAKER, DOBBINS. HANKER (1987)

Hexamethyldisilazane Drying for Rapid Detection of Bacteria in Implant Specimens. Proc. Ann Meet. Electr. Microsc. Soc. Amer. 45: 878-879, 1987.

GRAVELAND, HEERTJES (1975):

Removal of Manganese from Ground Water by Heterogenous Autocatalytic Oxidation; Trans. Inst. Chem. Engrs. Vol. 53; pp. 154-164

GROHMANN/HÄSSELBARTH/SCHWERDTFEGER (HSG.)

„DIE TRINKWASSERVERORDNUNG“ 4. AUFLAGE ERICH SCHMIDT-VERLAG 2003

HACKL (1962)

Chemisch-Mikroskopische Prüfung auf höhere Manganoxys; Fundamenta Balneo Biochimatomologica; 11, 1962, 54-75

HANERT, H. (1981A)

The Genus *Gallionella*, The Prokaryotes, 1981

HANERT, H.(1981B)

The Genus *Siderocapsa* and other Iron- or/and Manganeseoxidizing Eubacteria, The Prokaryotes 1981

HANERT, H. (1975)

Entwicklung, Physiologie und Ökologie des Eisenbakteriums *Gallionella ferruginea* Ehrenberg – Beiträge zu einer Monographie. Habilitationsschrift Naturwissenschaftliche Fakultät der Technischen Universität Braunschweig, Germany, p. 104

HANERT, H. (1968)

Untersuchungen zur Isolierung, Stoffwechselphysiologie und Morphologie von *Gallionella ferruginea* Ehrenberg. Archiv für Mikrobiologie 60: 348-376

HANERT, H. (1989)

Genus *Gallionella ferruginea* Ehrenberg 1838. In: Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig, N., Hold, J.G., editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 3 Baltimore: Williams & Williams. 1974-1979

HÄSSELBARTH, LÜDEMANN (1971)

Die Biologische Enteisung und Entmanganung; Vom Wasser, 1971 (38), 233-253

HEM, J.D., (1963)

Deposition and solution of manganese oxides: U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 1667-B, p. B1-B42.

JUNG, SCHWEISFURTH (1979)

Manganese oxidation by an intracellular protein of a *Pseudomonas* species; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 19, 2, 1979, p. 107-115

KAISERL. PATENTAMT/G. OESTEN (1900)

Verfahren zum Enteisenen von Grundwasser im Untergrunde selbst; Patentschrift des Kaiserl. Patentamtes Nr. 114709; Berlin 1900

KINZINGER (1987)

Zwei verschiedene Typen der Manganoxidation – Vergleichende Physiologische Untersuchungen an dem Chlamyobakterium *Leptothrix discophora* und an Manganoxidierenden Kapselbildenden *Pseudomonaden*; Diss. 1986; Technische Universität Braunschweig

KITTNER (1967)

Zur Enteisung in Schnellfiltern; Vortrag des 9. Fortbildungsseminars für Industriewasserwirtschaftler; WWT 17. Jahrgang (1967) Heft 10

LARSEN, SLY, MCEWAN (1999)

Manganese(II) adsorption and oxidation by whole cells and membrane fraction of *Pedomicrobium* sp. ACM 3067; Arch. Microbiol. (1999) 171:257-264

MADIGAN, MARTINKO, PARKER (2001)

Brock Mikrobiologie; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2001

MOUCHET (1992)

From Conventional to Biological Removal of Iron and Manganese in France; Research and Technology, Journal of American Water Works Association, Vol 84, Nr. 4 April 1992

MULDER, VAN VEEN (1963)

Investigations on the *Sphaerotilus-Leptothrix* group. Antonie von Leeuwenhoek; (1963) 29:121-153

NÄVEKE, TEPPER (1979)

Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden; G. Fischer Verlag Stuttgart 1979

OKAZAKI, SUGITA, SHIMIZU, OHNO, IWAMOTO, DE VRIES-DEJONG, DE VRIES

CORSTJENS (1997)

Partial Purification and Characterization of Manganese-Oxidizing Factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1;
Appl. and Environmental Microbiology, Dec. 1997, p. 4793-4799

PRINGSHEIM (1949)

Iron Bacteria. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 24:200-245

ROBBINS, CORLEY, CONKLIN (1999)

Manganese removal by the epilithic Microbial Consortium at Pinal Creek near Globe, Arizona; US Geological Survey Vol.1 März 8-12 1999 p. 247-258

RÜGER, WEIDNER (1980)

Versuche zur biologischen Enteisung und Entmanganung; In: Brunnenbau, Bau von Wasserwerken, Rohrleitungsbau, 2/1980

SCHMIDT (1979)

Morphologie und Physiologie Manganoxidierender Mikroorganismen; Diss. 1979; Universität Kiel

SCHMIDT (1984A)

Die Eisenbakterien des Plußsees; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 24, 6, 1984 p. 391-396

SCHMIDT, OVERBECK (1984B)

Studies of „iron bacteria“ from Lake Pluss; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 24, 5, 1984, p. 329-339

SCHWEISFURTH (1971)

Manganoxydierende Pilze ; 1. Vorkommen, Isolierungen und Mikroskopische Untersuchungen; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 11, 5, 1971, p. 415-430

SCHWEISFURTH (1972)

Manganoxydierende Pilze ; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 12, 8, 1972, p. 667-671

SCHWEISFURTH (1973)

Manganoxydierende Bakterien; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 13, 4, 1973, p. 341-347

SCHWEISFURTH (1976)

Manganoxydierende Bakterien; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 16, 2, 1976, p. 133-147

SIERING, GHORSE (1986)

Phylogeny of the Sphaerotilus-Leptothrix Group Inferred from Morphological Comparisons, Genomic Fingerprinting, and 16S Ribosomal DNA Sequence Analyses; Intern. Journ. Of System. Bacteriology; Jan. 1996, p. 173-182;

SPRING (2002)

The Genera Leptothrix and Sphaerotilus; in: The Prokaryotes; Electronical Release 2002

SPRING, KÄMPFER, LUDWIG, SCHLEIFER (1996)

Polyphasic Characterization of the Genus Leptothrix: New Descriptions of Leptothrix mobilis sp. Nov. and Leptothrix discophora sp. Nov. nom. Rev. and Emended Description of Leptothrix cholodnii emend. ; Sytem. Appl. Microbiol. 19, 634-643 (1996)

SVORCOVÁ (1975)

Iron Bacteria of the genus Siderocapsa in mineral waters; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 15, 7, 1975, p. 553-557

TYLER, MARSHALL (1967)

Pleomorphism in Stalked, Budding Bacteria; Journ. Of Bacteriology, Mar. 1967, p. 1132-1136

VANDENABEELE, WOESTYNE, HOUWEN, GERMONPRÉ, VANDENSANDE, VERSTRAETE (1995)

Role of Autotrophic Nitrifiers in Biological Manganese Removal from Groundwater Containing Manganese and Ammonium

ZINDULUS, EHRLICH (1983)

A novel Mn²⁺-oxidizing enzyme system in a freshwater bacterium; Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 23, 7, 1983, p. 457-465